

UCH-FC
Biotecnología
A282
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Construcción y verificación funcional de vectores
para sobre-expresar MdSDH, una Sorbitol
Deshidrogenasa de Manzana, e implementación de
un sistema de transformación estable de tomate.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

María Francisca Aguayo Arévalo

Director del Seminario de Título: **Michael Handford, PhD**

Junio de 2010
Santiago, Chile.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. María Francisca Aguayo Arévalo

“Construcción y verificación funcional de vectores para sobre-expresar MdSDH, una Sorbitol Deshidrogenasa de Manzana, e implementación de un sistema de transformación estable de tomate”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dra. Claudia Stange
Co-Director

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Ricardo Cabrera
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza
Evaluador

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Diciembre de 2010



Nací una día 26 de Marzo de 1985, luego de 48 horas de inmensa espera para mi familia y fuertes contracciones para mi madre. Ella siempre cuenta este hecho de forma anecdótica, relacionándolo con mi carácter. La primera nieta por ambas partes, materna y paterna, tuve una infancia muy feliz, en donde fui el centro de atención durante dos años, ocasión en que nació mi hermana Camila y un año más tarde, "la feñita" el conchito de la familia.

Mis padres, se esforzaron siempre por darnos lo mejor de ellos. A pesar de las dificultades económicas que pasamos por esos años, gracias a su esfuerzo jamás nos faltó nada. Mantengo hermosos recuerdos de nuestros viajes y celebraciones familiares, que por supuesto organizaba mi padre, siempre tan alegre e hiperactivo.

Ingresé al colegio municipal Sagrado Corazón con 5 años de edad para cursar kinder. Como buen colegio católico y de sólo niñas, me dio una enseñanza bastante estricta y conservadora durante los seis años que cursé en el establecimiento. En él forme lindas amistades que aun mantengo y atesoro hermosos recuerdos. Mi padre formó en mí importantes hábitos de estudio, los cuales se vieron reflejados en premios de "mejor alumna" durante algunos años. También fui elegida presidenta de curso durante dos años y mejor compañera, siendo este último premio para mí, uno de los reconocimientos más valiosos que se puede recibir. Sin embargo, no todos fueron bellos recuerdos. Cuando tenía 7 años a mi padre le diagnosticaron un tipo de cáncer bastante complejo y desconocido, con un pronóstico de vida no más allá de 6 meses. Su gran fortaleza, alegría e inmensas ganas de vivir le permitieron acompañarnos durante dos años más allá del pronóstico médico, años de momentos muy felices y también muy dolorosos. Su muerte en el año 1994, trajo para nosotras un cambio radical de vida que se acompañó además de un cambio de casa, al barrio alto de Santiago, fruto del esfuerzo y excelente trabajo realizado por mi madre.

En Las Condes, ingrese al colegio municipal y mixto Amanda Labarca, lugar en que curse 7 y 8 básico. Mantuve muy buenas notas por las cuales recibí aportes monetarios de la municipalidad y fui también elegida como mejor compañera, un gran orgullo para mí. Conocí a mis grandes amigos de la vida y disfrute de preciosos momentos.

Por su gran prestigio, ingrese para cursar la educación media al liceo 7 de niñas de Providencia. Desde primer año me maraville con la ciencia, especialmente con la biología. Recuerdo, esperar con ansias las clases de evolución de la profesora Nelly y las locas clases de Sistema nervioso que impartía el profesor Sergio Ortiz. Según mi madre, el gusto por la biología lo traía en los genes, ya que mi padre siempre añoró la investigación, estudió Biología y enfermería obstetricia en la universidad Católica, y de alguna manera debe haberme transmitido este gran interés durante los nueve años que pude compartir con él. En el liceo, recibí lindos reconocimientos y conocí maravillosas personas.

Frente a varias incertidumbres de que área elegir dentro de la Biología, preferí ingresar al programa de Bachillerato en ciencias de nuestra Universidad, luego de terminar mi educación media. Decisión que hasta hoy en día considero muy acertada, ya que este programa logre conocer una visión amplia e integrada de todas las ciencias, tanto humanistas como científicas, me permitió distinguir mi fuerte interés en la investigación y conocer la carrera Ingeniería en Biotecnología, desconocida para mí hasta ese momento, a la cual ingresé transcurridos mis dos años de bachillerato.

Los años de estudio en Biotecnología, carrera que finaliza con este Seminario de Título, fueron muy difíciles y exigentes, sin embargo, mantengo de ellos hermosos recuerdos. Gracias a las valiosas amistades que forme, las interminables tardes y noches de estudio se convirtieron en momentos muy amenos. Durante mis últimos años de formación profesional mis intereses me guiaron al área de la Biotecnología vegetal, en particular a líneas de investigación que utilicen herramientas de biología molecular con el fin de modificar y mejorar cultivos agrícolas de importancia nacional. Este interés me llevó a ingresar en el año 2008 al laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias. En este lugar, bajo la tutela del Dr. Michael Handford tuve la oportunidad de realizar dos unidades de investigación y mi Seminario de Título, el cual se presenta en las siguientes páginas.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi bella familia, las personas que más quiero en este mundo. Gracias por su incondicional apoyo, infinito cariño y maravillosa compañía. Gracias en especial a ti mamá, por tu immedible esfuerzo por hacer de mis días, días felices. Admiro tu gran valor, fuerza y esfuerzo. Mis logros son sin duda, fruto de tu trabajo.

Gracias a mis dos hermanitas Cami y Feñis, por enseñarme y ayudarme a ser cada día mejor persona. Cami, admiro tu tenacidad y la perseverancia con que logras todas tus metas. Feñita, con tu inmensa alegría a pesar de los grandes problemas que has vivido, me haces no olvidar lo importante y valioso que es cada día.

Gracias a mi querida abuelita "nana" por cuidarnos, acompañarnos y regalarnos en todos los momentos, eres y serás siempre mi segunda madre, te adoro.

Gracias a mi padre por tan lindos recuerdos. Sé que desde donde estas, ayudas y guías mi camino. No te imaginas cuanto te extraño, papá. Espero te sientas orgulloso de mí y de la persona que me he convertido.

También quisiera agradecer a mis grandes amigos: Daniel, Cami, Jani, Ange, Kathy, Fefi y Nacho. Con cada uno de ustedes he vivido los más lindos momentos, gracias por su apoyo constante, sus excelentes consejos y sé que a pesar de las distancias, nos queremos infinitamente y lograremos mantener nuestra amistad hasta que seamos muy viejitos.

Gracias a mis compañeros de estudios Cinthia, Yu, Gi, Cami, Nelly, Darius y Nico por hacer de lateras tardes de estudio momentos mas amenos. No se imaginan lo importante que fueron para mí durante estos cinco años de carrera. Los quiero muchísimo.

Gracias a mi lindas amigas ("Lps"): Vale, Gi, Chica, Fefi, Lore, Ori y Claudilla por su alegría y compañía en tantas ocasiones, carretes, San Jueves y juntaciones varias. Jamás olvidare nuestras memorables canciones y bailes. Alegraron enormemente mis últimos años de pre-grado.

Agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio BMV por acogerme y hacer de días de trabajo y estrés tan agradables momentos. He aprendido mucho de cada uno de ustedes, son maravillosas personas. En especial quisiera agradecer al profe Mike por su gran comprensión, confianza y empuje. En momentos de reiterados fracasos, sus palabras fueron un gran aliento para mí, necesarias para continuar. Gracias al team MH por su constante colaboración. Gracias a la Pauli, Juank, Mati, Carlitos R y S, andresin, Nalli, Charlie y Patito por su gran disposición, su constante buena onda y por alegrar cada día nuestro lab. Agradezco también a Ange y Sebi, por su gran ayuda diaria.

Por último (y más importante) quisiera agradecer a Diego ("mi gordo"), la personita más linda de este mundo. El conocerte y amarte ha sido una de las cosas más hermosas de mi vida. Gracias por tu infinito apoyo y tu incondicional ayuda. Admiro tus inmensas ganas de conocer y viajar, tu eficiencia y perseverancia en lo que te propones, el gran orden que pones en todo lo que haces y tu forma de ver la vida, que espero acompañar y compartir por siempre. Sin duda fuiste quien me impulso, ayudo y acompañó las largas noches que permitieron escribir este texto en poco tiempo. Gracias mi amor por tanto. Gracias por hacerme feliz Te amo infinitamente.



A mi querida madre...
por su infinito amor, fuerza y coraje.

INDICE



Listado de Figuras	V
Listado de Tablas	VII
Abreviaturas y definiciones	VIII
Resumen	X
Abstract	XII
1. Introducción	01
1.1 Situación país: Aspectos generales	01
1.1.1 Generación de nuevas variedades de frutales	02
1.1.2 Manzanas chilenas	03
1.2 Metabolismo de azúcares en manzanas	04
1.2.1 Dulzor de un fruto	04
1.2.2 Acumulación de azúcares en manzanas	04
1.2.3 Metabolismo del sorbitol	05
1.2.4 Sorbitol deshidrogenasa	06
1.3 Sobre-expresión fruto-específica de <i>SDH</i>	10
1.4 Transformación transitoria y estable de sistemas vegetales	11
1.5 Estrategia desarrollada	13
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. Materiales y Métodos	15
3.1 Reactivos	15
3.2 Material Biológico	15
3.2.1 Obtención de frutos y hojas de manzanos	15
3.2.2 Obtención de frutos de tomate y durazno para ensayos de expresión	15
3.2.3 Obtención de semillas para transformación estable de tomate	16
3.2.4 Cepas de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> utilizadas	16
3.3 Trabajo con bacterias	16
3.3.1 Crecimiento de bacterias	16
3.3.2 Obtención de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes	16
3.3.3 Transformación de <i>E. coli</i> por golpe térmico	17
3.3.4 Obtención de células quimiocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	17
3.3.5 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> por golpe térmico	17
3.4 Extracciones de ADN	18
3.4.1 Purificación de ADN plasmidial desde <i>Echerichia coli</i>	18
3.4.1.1 Método de purificación de ADN plasmidial alternativo	18
3.4.1.2 Método de purificación de ADN plasmidial mediante kit comercial	19
3.4.2 Purificación de ADN plasmidial de <i>A. tumefaciens</i>	19



3.4.3 Purificación de ADN genómico desde plantas de tomate	19
3.5 Extracciones de ARN	20
3.5.1 Extracciones de ARN de frutos	20
3.5.2 Extracciones de ARN de hojas	21
3.6 Métodos de biología molecular	21
3.6.1 Cuantificación y análisis de calidad del ADN y ARN total	21
3.6.1.1 Visualización y cuantificación mediante geles de agarosa	21
3.6.1.2 Cuantificación y análisis de calidad mediante espectrofotómetro	22
3.6.2 Diseño de partidores específicos para la clonación de <i>MdSDH3</i>	22
3.6.3 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	23
3.6.4 Reacciones de PCR	24
3.6.4.1 Amplificación del ADNc de <i>MdSDH3</i> mediante PCR	24
3.6.4.2 Reacción de PCR de colonia	27
3.6.5 Digestiones enzimáticas	27
3.6.5.1 Digestiones enzimáticas para la selección de clones positivos	27
3.6.5.2 Digestión doble de los vectores de clonación y expresión con las endonucleasas <i>SpeI</i> y <i>NheI</i> , mediante digestión parcial	28
3.6.5.3 Digestión doble de los vectores de clonación y expresión con las endonucleasas <i>SpeI</i> y <i>PmlI</i>	28
3.6.6 Purificación de ADN desde geles de agarosa	28
3.6.7 Secuenciación	29
3.7 Construcciones genéticas	29
3.7.1 Clonamiento de <i>MdSDH</i> por el sistema pCR [®] 8	29
3.7.2 Construcción de vectores de sobre-expresión de <i>MdSDH</i> en plantas	30
3.7.2.1 Vectores binarios de sobre-expresión utilizados	30
3.7.2.2 Construcción de vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica para <i>MdSDH</i>	30
3.8 Análisis de expresión	32
3.8.1 Transformación transitoria de frutos y hojas	32
3.8.2 Microscopía de fluorescencia	32
3.9 Cultivo <i>in vitro</i> y transformación de tomates	33
3.9.1 Cultivo <i>in vitro</i> : Esterilización y sembrado de semillas de tomate	33
3.9.2 Obtención de explantes de tomate tipo flamingo	33
3.9.3 Transformación de explantes tipo flamingo mediante <i>A. tumefaciens</i>	34
3.9.4 Regeneración de explantes de tomate mediante organogénesis somática	34
3.9.5 Análisis mediante PCR para confirmar plantas de tomate transgénicas	35
4. Resultados	36
4.1 Clonación del ADNc de <i>MdSDH</i> en un vector bacteriano	36
4.1.1 Primer intento de clonación del ADNc de <i>MdSDH3</i>	36
4.1.2 Segundo intento de clonación de <i>MdSDH3</i>	39
4.1.3 Análisis de las secuencias obtenidas	41

4.2 Construcción de vectores de sobre-expresión de <i>MdSDH</i> en plantas	42
4.2.1 Primera estrategia de clonación <i>MdSDH2</i> en vectores de sobre expresión	44
4.2.2 Segunda estrategia de clonación <i>MdSDH2</i> en vectores de sobre-expresión	48
4.2.3 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con los vectores de sobre expresión	50
4.3 Análisis de funcionalidad de los vectores de expresión contruidos	50
4.3.1 Análisis mediante microscopia de epifluorescencia	51
4.3.2 Análisis molecular de la expresión de <i>MdSDH2</i>	52
4.4 Implementación de un sistema de transformación estable de tomate	54
4.4.1 Generación de plantas transgénicas de tomate	54
4.4.2 Análisis molecular de las líneas generadas para confirmar la transgénesis en plantas de tomate transformadas establemente.	57
5. Discusión	59
6. Conclusiones y Proyecciones	65
7. Congresos	67
8. Referencias	68



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de sorbitol en manzanos	06
Figura 2: Reacción catalizada por sorbitol deshidrogenasa (SDH).	07
Figura 3. Expresión de las cuatro isoformas (<i>MdSDH1-4</i>) descritas en manzana <i>cv Fuji</i> en diferentes tejidos y distintos estadios en el desarrollo del fruto	09
Figura 4. Determinación de la integridad del ARN extraído de frutos de manzana	36
Figura 5. Amplificación del gen <i>18S</i> y <i>MdSDH3</i> a partir de ADNc de manzana	37
Figura 6. Amplificación de <i>MdSDH3</i> a partir de ADN plasmidial de clones positivos seleccionados previamente por PCR de colonia	38
Figura 7. Digestión enzimática de pCR8-MdSDH con <i>BstEII</i>	38
Figura 8. Muestra de ARN de hojas y amplificación de <i>MdSDH3</i> a partir de ADNc	40
Figura 9. Digestión con <i>BstEII</i> del ADN plasmidial de clones positivos evaluados previamente por PCR de colonia.	41
Figura 10. Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de MdSDH2cvFuji, MdSDH3 cv Fuji, MdSDH2 cv Mutsu y dos de las secuencias clonadas	43
Figura 11. Esquema de la estrategia general desarrollada para la clonación de MdSDH en los vectores binarios derivados de pCambia.	44
Figura 12. Digestión doble de los vectores de sobre-expresión 35S-GFP y PG-GFP con las enzimas <i>SpeI</i> y <i>NheI</i>	45
Figura 13. Digestión parcial de los vectores de sobre-expresión 35S-GFP y PG-GFP con las enzimas <i>SpeI</i> y <i>NheI</i>	46
Figura 14. PCR de colonia para evaluar clones portadores de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2	46
Figura 15. PCR para evaluar la orientación del inserto en construcciones PG-MdSDH2	47
Figura 16. Ensayos de restricción para clon 17	47
Figura 17. Doble digestión con las enzimas <i>SpeI</i> y <i>PmlI</i> de los vectores pCR8-Pml1, 35S-GFP y PG-GFP	49
Figura 18. Ensayo de restricción con <i>BstEII</i> de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2	50
Figura 19. PCR a partir de ADN plasmidial de <i>A. tumefaciens</i> para evaluar clones portadores de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2	51
Figura 20. Comprobación de la funcionalidad de los vectores 35S-GFP y PG-GFP mediante transformación transitoria de tabaco y frutos de tomate	53

Figura 21. Amplificación de gen 18S y <i>MdSDH2</i> a partir de muestras de ADNc obtenido de hojas de tabaco y frutos de duraznos transformados transitoriamente con los vectores 35S-MdSDH y PG-MdSDH	54
Figura 22. Organogénesis somática de explantes de tomate transformados con 35S-LeSDH y PG-LeSDH mediante <i>A. tumefaciens</i>	56
Figura 23. Controles de transformación mantenidos durante 4 semanas en medio de inducción	57
Figura 24. Amplificación del gen de resistencia a higromicina como evidencia de la transgénesis de plántulas de tomate obtenidas mediante organogénesis somática	58

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Programas de PCR utilizados para el desarrollo de este Seminario de Título	25
Tabla II. Partidores utilizados en este Seminario de Título	26
Tabla III. Composición Medios de Cultivo <i>in-vitro</i> de tomate	35
Tabla IV. Porcentajes de identidad nucleotídica obtenidos a partir del alineamiento de la secuencia para el clon F5 con isoformas descritas para SDH en manzanos	39

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

A₂₆₀	Absorbancia medida a 260 nm
Agua NP	Agua nano pura (libre de nucleasas)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T	Acido desoxirribonucleico de transferencia
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
cols	colaboradores
CTAB	Cetil trimetil amonio bromuro
cv	Variedad cultivada
cm³	centímetros cúbicos
D.O.₆₀₀	Medición de densidad óptica a 600 nm.
ddf	días después del florecimiento completo (<i>after full bloom</i>)
DEPC	Diethylpirocarbonato
dNTP	Desoxiribonucleótido Tri-fosfato
dT	Desoxitimidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramo (s)
gpf	gramos de peso fresco
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent proteína</i>)
hptII	gen de la higromicina fosfotransferasa (Gen de resistencia a higromicina)
hr	hora (s)
kb	Kilo base
LB	Medio Luria Bertani
LeSDH	Sorbitol deshidrogenasa de tomate
M	Molar
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
min	minuto (s)
MdSDH	Sorbitol deshidrogenasa de manzano
mM	Mili Molar
mm	mili metros
ml	mili litros
MS	Medio Murashigue & Skoog

NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
ng	nano gramo
OGM	Organismos genéticamente modificados
pb	Par de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PG	Poligalacturonasa
PM	Peso molecular
PVP	Poli vinil pirrolidona
rpm	revoluciones por minuto
RT	Reacción de transcriptasa reversa
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SGPT	silenciamiento génico post-transcripcional
TAE	Tris-acetato EDTA
T-Nos	Terminador de nopalina sintasa
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
U	unidad enzimática
UTR	Región no traducible (<i>untranslated region</i>)
°C	Grado Centígrado
µg	Micro Gramo
µl	Micro Litro
µM	Micro Molar

RESUMEN

El sorbitol es el principal producto de la fotosíntesis y el mayor componente floema-translocado en una gran cantidad de plantas de importancia económica que pertenecen a la familia de las Rosáceas. En estas plantas durante el desarrollo de los frutos, la mayoría del sorbitol es metabolizado a otro azúcar, fructosa. Esta conversión natural contribuye al aumento en el dulzor de los frutos durante la maduración, debido a que la fructosa presenta el doble de sensación de dulzor que el sorbitol, sin embargo no todo el sorbitol es metabolizado durante el proceso. La enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) cataliza la oxidación de sorbitol en frutos, por lo que una estrategia para aumentar su dulzor sería favorecer la inter-conversión del sorbitol a fructosa, mediante la sobre-expresión de SDH.

En manzana se han identificado 9 genes que codifican para SDH, siendo 2 de ellos caracterizados a nivel bioquímico (*MdSDH2* y 3). Ambas isoformas catalizan la oxidación de sorbitol casi cuatro veces más que la reacción reversa, siendo *MdSDH3* la que presenta mayor actividad enzimática registrada y por lo tanto se presenta como un buen candidato para la modificación de la calidad de azúcares presente en organismos vegetales. En este contexto, la sobre-expresión fruto-específica de *MdSDH*, y particularmente *MdSDH3*, permitiría generar mediante transgénesis una nueva variedad de manzanos con frutos de mayor dulzor.

Con este fin en el presente Seminario de Título se desarrollaron estrategias para clonar *MdSDH3*. Eventualmente, se logró clonar la isoforma 2 de SDH (*MdSDH2*) en un sistema bacteriano, a partir del cual se generaron vectores binarios de sobre-expresión en donde el ADNc de *MdSDH2* es controlado por el promotor fruto-específico de la poligalacturonasa (PG) y un promotor constitutivo (CaMV 35S). *Agrobacterium tumefaciens* portadora de los vectores binarios de sobre-expresión generados, permitió transformar de manera transitoria hojas (tabaco) y frutos (tomate y durazno) mediante la técnica de agro-infiltración y agro-inyección, respectivamente, lo cual permitió llevar a cabo análisis de expresión de *MdSDH2* a nivel

molecular. La evaluación del funcionamiento del promotor PG y los análisis de expresión de *MdSDH2*, mostraron que los vectores binarios de sobre-expresión de SDH realizados, funcionaron correctamente.

Con el objetivo de evaluar *MdSDH2* y otras SDHs vegetales es necesario implementar un sistema de transformación estable en especies de características fenotípicas o fisiológicas conocidas, cuyo ciclo de vida sea corto. El tomate resulta ser un buen candidato y modelo interesante para el estudio funcional de genes, especialmente en frutos. En el presente trabajo, se logró implementar la transformación estable de tomate obteniendo plantas transformadas con *A. tumefaciens* portadora de vectores de sobre-expresión para *LeSDH*, una SDH de tomate.

Los vectores de sobre-expresión para *MdSDH2* y la plataforma de transformación implementada en este Seminario de Título, permitirá evaluar en un futuro a nivel molecular y bioquímico que SDH de plantas será la más adecuada para ser sobre-expresada en manzanos, con el objetivo de generar una variedad de manzanas chilenas con un mayor dulzor.

ABSTRACT

Sorbitol is the main photosynthetic product and the major phloem-translocated component in a large number of economically-important plants belonging to the Rosaceae family. In these plants, most of the sorbitol is metabolized to other sugars, such as fructose during fruit development. This natural conversion contributes to the increase in the sweetness of the fruit during ripening, as fructose has twice the sensation of sweetness than sorbitol; however, not all sorbitol is metabolized during this process. The enzyme sorbitol dehydrogenase (SDH) catalyses the oxidation of sorbitol in fruits. The over-expression of SDH in fruits is thus a strategy to increase their sweetness by stimulating the inter-conversion of sorbitol to fructose.

Nine genes have been identified that encode SDHs in apple, and two of them have been characterised at the biochemical level (*MdSDH2* & 3). Both isoforms catalyse the oxidation of sorbitol four times more than reverse reaction, and *MdSDH3* has the highest enzyme activity recorded and therefore is presented as a good candidate for the modification of sugars present in plants. In this context, the fruit-specific over-expression of *MdSDH*, and particularly *MdSDH3*, could be used to generate a new breed of transgenic apple trees with higher fruit sweetness.

In this thesis, several strategies were developed to clone *MdSDH3*. The isoform 2 of SDH (*MdSDH2*) was eventually cloned in a bacterial system, from which over-expression binary vectors in which the *MdSDH2* cDNA is controlled by the fruit-specific polygalacturonase (PG) promoter and a constitutive promoter (CaMV 35S), were developed. *Agrobacterium tumefaciens* carrying these over-expression binary vectors were generated, and leaves (tobacco) and fruits (tomato and peach) were transiently transformed by agro-infiltration and agro-injection, respectively, allowing the expression of *MdSDH2* to be analysed at the molecular level. The evaluation of the function of the PG promoter and of the expression of *MdSDH2* showed that the SDH over-expression binary vectors functioned correctly.

In order to evaluate *MdSDH2* and other plant SDHs it is necessary to implement a stable transformation system in species with known phenotypical and physiological characteristics and a short life cycle. Tomato is a good candidate and an interesting model for the functional study of genes, especially in fruits. In this study, we were able to implement the stable transformation of tomato by *A. tumefaciens* carrying *LeSDH* over-expression vectors, a tomato SDH.

The *MdSDH2* over-expression vectors and the transformation platform implemented during this thesis, will allow a molecular and biochemical study of which plant SDH is the most appropriate to be over-expressed in apple trees, with the aim of generating a Chilean apple variety with greater sweetness.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación país: Aspectos generales

Desde los años 80 la agricultura chilena ha venido consolidando una exitosa estrategia de internacionalización que se funda en la plena apertura de la economía al exterior. Chile ha logrado incrementar en un 149% sus exportaciones agrícolas en los últimos ocho años (www.indap.gob.cl). Como resultado de estas transformaciones, el sector agro-alimentario constituye uno de los pilares del desarrollo económico de nuestro país (ODEPA, 2005).

Dentro de este rubro, las exportaciones de fruta fresca e industrializada son un componente fundamental. Nuestro territorio presenta condiciones geográficas y climáticas favorables para el cultivo de frutales, principalmente en la zona central y debido a su posición de contra estación con el hemisferio Norte, puede abastecer a estos países cuando su producción local es baja. Estos dos aspectos, han permitido que Chile sea un importante exportador de fruta fresca a Europa y Estados Unidos, con una tasa de crecimiento promedio anual de 8% (ODEPA, 2005).

De acuerdo a cifras del Centro de Comercio Internacional de las Naciones Unidas, en el año 2008 Chile figuró como el mayor exportador mundial de uva de mesa y arándanos, y el primer exportador del hemisferio Sur de frutos de manzanas, paltas, cerezas y ciruelas. Estos datos generan un gran desafío en la industria frutícola chilena, ya que debe mantener e incrementar su liderazgo hemisférico y mundial en la exportación de estos productos (ODEPA, 2009).

Lograr una mayor exportación futura hace imprescindible abrir nuevos mercados, y fortalecer la presencia en los mercados actuales. Con este fin surge la necesidad de generar nuevas y mejores variedades de frutas. A la fecha, varios consorcios han sido creados con el objetivo de aumentar la rentabilidad y competitividad de la industria frutícola de exportación, a través de la implementación de un programa nacional de investigación orientado a obtener nuevas variedades o mejorar las actuales (www.chilepotenciaalimentaria.cl).

1.1.1. Generación de nuevas variedades de frutales

Los programas de mejoramiento genéticos implementados en nuestro país apuntan principalmente a dos aspectos; desarrollar frutales con menor susceptibilidad a diferentes patógenos y a mejorar sus características organolépticas, con las cuales se hace referencia al sabor, aroma, textura, astringencia y dulzor de un fruto.

Para introducir nuevas características a una especie vegetal, en Chile se ha utilizado el fitomejoramiento clásico, proceso que se basa en la adquisición de caracteres de interés mediante la cruce selectiva de variedades. Por ejemplo, se generó la variedad de vid Iselia-INIA con mejores características organolépticas, mediante el cruce de las variedades Flame Seedless y Centennial (Hewstone y cols, 2007). Esta nueva variedad chilena presenta bayas sin semilla y un suave sabor moscatel que madura tempranamente, lo que permite incorporarla en el mercado exportador de forma previa a las variedades comercializadas. Este tipo de ejemplo sigue siendo escaso en nuestro país, debido a que el proceso de fitomejoramiento es una técnica bastante difícil, laboriosa y con resultados a largo plazo (promedio 15 años). Por esta razón, Chile ha optado por incorporar nuevas variedades extranjeras, mediante el pago de royalty, con el fin de mantener su liderazgo regional en la exportación de fruta fresca.

Un nuevo escenario se ofrece durante la última década como alternativa al fitomejoramiento. La biotecnología, mediante la ingeniería genética y el desarrollo de organismos genéticamente modificados (OGM), permite integrar nuevas características de forma específica y selectiva a un organismo, desarrollando las variedades deseadas en un tiempo más corto y de forma más eficiente. Se han desarrollado importantes adelantos a nivel mundial en este ámbito de lo cual Chile ha sido partícipe de manera creciente. Tanto la investigación como el financiamiento de proyectos que involucren el desarrollo biotecnológico en especies frutícolas de interés han sido subsidiados por el gobierno con el fin de diversificar y mejorar la competitividad del sector exportador. El marco regulatorio chileno para cultivos genéticamente modificados permite la

propagación y exportación de semillas de OGM, y su desarrollo en la investigación científica. Chile cuenta con proyectos en desarrollo en las principales especies exportadas como nectarines, cítricos, paltas, vid y arándanos. Sin embargo en pomáceas, género que incluye peras y manzanas, la investigación e innovación aún es escasa.

1.1.2. Manzanas chilenas.

El manzano doméstico (*Malus x domestica*) perteneciente a la familia Rosácea, es una especie de gran importancia económica para nuestro país al constituir la segunda fuente de ingreso más alta por exportación, luego de la vid (USD 626 millones, www.odepa.gob.cl). Por estos motivos ha sido de gran interés para la industria chilena mantener su participación en mercados internacionales, junto con adaptar los cambios ocurridos en las variedades comercializadas a nivel mundial. Uno de estos cambios, fue la incorporación de variedades de manzana bicolor obtenidas por fitomejoramiento en el extranjero (Fuji, Royal Gala y Pink Lady) las cuales actualmente superan el 50% de las exportaciones chilenas (www.odepa.gob.cl).

Para lograr una mayor producción en el sector es necesario fortalecer mercados emergentes. Uno de estos mercados es Asia, el cual ha ido incrementando los volúmenes de manzanas importadas en los últimos años, en particular de la variedad Fuji. Estudios de mercado indican que consumidores asiáticos prefieren frutos de mayor dulzor (Janick y cols, 1996), por lo cual desarrollar variedades de manzana que sean atractivas para ellos deben presentar esta característica organoléptica potenciada. Con este objetivo se adjudicó en el año 2007 el proyecto Innova-CORFO titulado “*Desarrollo de plántulas de una variedad premium de manzanas con mayor dulzor mediante el uso de herramientas biotecnológicas*” dirigido por el Dr Michael Handford (Universidad de Chile) en el cual se enmarca el presente Seminario de Título.

1.2. Metabolismo de azúcares en manzanas

1.2.1. Dulzor de un fruto.

El dulzor es una de las características organolépticas más apreciadas en frutos. Las moléculas naturales que aportan dulzor a estos órganos son los azúcares y su forma reducida, alcoholes de azúcar, también llamados polioles. Dentro de la categoría de azúcares se encuentran el disacárido sacarosa y los monosacáridos fructosa y glucosa. Los alcoholes de azúcar, por su parte, incluyen el sorbitol, xilitol y manitol.

Tanto los azúcares como los polioles presentan distintos grados de poder edulcorante (dulzor), lo que hace que la proporción de éstos sea muy importante en determinar el dulzor final del fruto. Comparando la capacidad edulcorante de los distintos azúcares mencionados, sorbitol es la que presenta menor poder edulcorante, siendo éste un 10% menos dulce que la glucosa, 40% menos que la sacarosa y 60% menos que la fructosa (Burt, 2006). Por lo tanto, lo dulce que pueda llegar a ser el fruto, depende tanto de la cantidad de azúcares que posee, como de la composición de éstas.

1.2.2. Acumulación de azúcares en manzanas.

Durante el desarrollo y maduración de los frutos, ocurren cambios fisiológicos importantes que conllevan a un aumento en la concentración de azúcares en las células del mesocarpo (pulpa). En manzanas, los azúcares que aportan el dulzor durante el proceso de maduración, provienen de dos fuentes. La primera fuente está constituida principalmente por el polisacárido almidón (Moggia y Pereira, 2006). Durante el desarrollo de la fruta, la concentración de almidón aumenta drásticamente, desde niveles mínimos de 1 mg/g de peso fresco (mg/gpf) registrados 30 días después de la floración (ddf) a 25 mg/gpf transcurridos 130 días. La etapa de maduración del fruto ocurre posteriormente (150 ddf), en donde la concentración de almidón comienza a disminuir, debido a un incremento en la actividad de amilasas y otras enzimas involucradas en

su catabolismo. Durante esta etapa se hidroliza el almidón, a azúcares simples con un consecuente aumento en la concentración de glucosa en la pulpa (Brookfield y cols, 1997).

La segunda fuente principal de azúcares, son aquellos importados a la fruta (fuente exógena). Durante la maduración, la mayoría de los frutos no realizan fotosíntesis por lo cual son incapaces de generar sus propias fuentes de carbono. Los azúcares que se incorporan son sintetizados a larga distancia por hojas maduras que realizan fotosíntesis. Por esta razón se han denominado "órganos sumideros" a frutos, raíces y hojas jóvenes, mientras que se le llama "órgano fuente" a hojas maduras fotosintéticamente activas. El transporte de azúcares desde el órgano fuente hacia órganos sumideros se realiza mediante el floema. La mayoría de las especies vegetales transportan sacarosa como principal fotosintato. Sin embargo, especies de la familia *Rosaceae* transportan la mayoría del carbono en forma de sorbitol. Este alcohol de azúcar, es el producto principal de la fotosíntesis y corresponde a más del 80% de los carbohidratos trasladados por el floema del manzano (Loescher y col, 1982).

1.2.3. Metabolismo del sorbitol

La biosíntesis de sorbitol ocurre en el citoplasma de células de hojas maduras por la acción de la enzima sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADPH (S6PDH). Esta enzima cataliza la reducción del producto de fotosíntesis glucosa-6-fosfato en sorbitol-6-fosfato (Figura 1). Posteriormente, el sorbitol-6-fosfato es convertido en sorbitol por la enzima sorbitol-6 fosfato fosfatasa (S6PP). Una vez sintetizado, el sorbitol es transportado a través de la membrana plasmática y trasladado por el floema hacia órganos sumideros (Teo y cols, 2006; Patrick y cols, 2001). La ruta de egreso de sorbitol del floema hasta las células de la pulpa en frutos de manzanas es a través de la vía apoplástica mediante transportadores específicos (Gao y cols, 2005; Zhang y cols, 2004). Ingresado en las células, el sorbitol es metabolizado rápidamente a fructosa, mediante la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH). Tanto fructosa como otros azúcares son almacenados en la vacuola de las células permitiendo mantener la gradiente de

concentración, lo que facilita el paso de sorbitol desde el órgano fuente hacia el fruto (Jackson, 2003). A pesar de esto, existe un remanente constante de sorbitol en los frutos de manzanas a medida que estos maduran. Se ha descrito que de 4 a 13 mg de sorbitol/gpf no sufre la conversión a fructosa (Yamada y cols, 2006; Ohkawa y cols, 2008). Esta fracción de sorbitol tiene la potencialidad de ser metabolizado a azúcares con más poder edulcorante, como la fructosa y así otorgarle mayor dulzor al fruto.

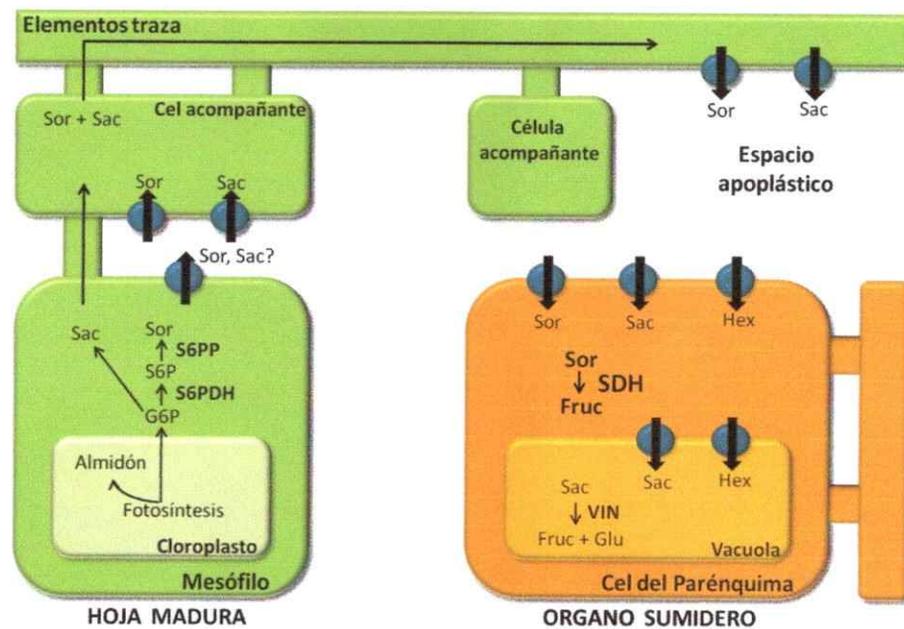


Figura 1: Metabolismo de sorbitol en manzanas: El sorbitol (Sor) y la sacarosa (Sac) son sintetizados en hojas maduras desde G6P (glucosa-6-fosfato). El sorbitol es sintetizado mediante la enzima sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) y sorbitol-6-fosfato fosfatasa (S6PP). Translocado hacia el floema, el sorbitol es egresado hacia la vía apoplástica de órganos sumideros mediante transportadores específicos. En el fruto, sorbitol es convertido a fructosa (Fruc) por la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH) y almacenada en la vacuola mediante transportadores de hexosas (Hex). La sacarosa es convertida a fructosa y glucosa (Glu) por invertasas (VIN). Modificado y traducido de Teo y cols, 2004.

1.2.4. Sorbitol deshidrogenasa

La enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH, EC 1.1.1.14) es la principal enzima en el metabolismo del sorbitol en los frutos de especies Rosáceas, aunque también ha sido identificada en una gran variedad de organismos, entre los que se incluyen especies no rosáceas (tomate; Otha y cols, 2005) mamíferos (humanos, oveja y bovino; Lindstad y cols, 1998; Marini y cols, 1997) y

microorganismos (*Bacillus subtilis*; Ng y cols, 1992). Debido a su importante función, SDH ha sido caracterizada a nivel molecular. Se han identificado regiones conservadas en su secuencia, incluyendo un dominio de unión a zinc, sitio de unión a la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y los residuos involucrados en el sitio catalítico de unión preferente a sorbitol (Otha y cols, 2005; Pauly y cols, 2003).

SDH cataliza la reacción reversible de oxidación que convierte sorbitol a fructosa con la reducción del cofactor NAD^+ (Figura 2). Análisis cinéticos revelan que la tasa de oxidación de sorbitol es diez veces más alta que la registrada en la reducción de fructosa, indicando que la reacción catalizada por SDH favorece la conversión de sorbitol a fructosa mucho más que la reacción reversa (Yamaguchi y cols, 1994). Análisis de especificidad de sustrato indican que otros polioles como iditol, xilitol y ribitol son también oxidados por SDH en presencia de NAD^+ a sus correspondientes cetosas (sorbosa, xilulosa, ribulosa) observándose una actividad relativa entre 13-88% con respecto a su sustrato preferente, sorbitol (Marini y cols, 1997; Oura y cols, 2000). Estos alcoholes de azúcar comparten una estereoquímica quiral específica en el C-2 (S) y C-4 (R), lo cual explica que otros polialcoholes como manitol (C-2(R), C-4(R)) y galactitol (C-2(S), C-4(S)) no sean reconocidos como sustrato (Oura y cols, 2000).

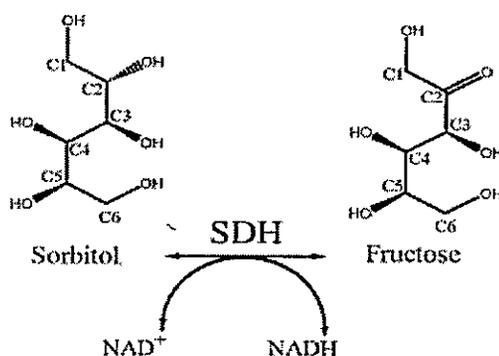


Figura 2: Reacción catalizada por sorbitol deshidrogenasa (SDH). La reacción favorece la oxidación de un grupo alcohólico secundario presente en el carbono 2 del sorbitol a un grupo cetona, convirtiendo sorbitol en fructosa. Para catalizar esta reacción SDH requiere NAD^+ como cofactor.

Los principales estudios de las SDH en plantas han sido orientados a evaluar su expresión y actividad en distintos estados de desarrollo de la planta y de sus órganos. Específicamente en manzanos, se han clonado varios ADNc que codifican para *SDH* (Yamada y cols, 1998; Park y cols, 2002; Nosarszewski y cols, 2004). Nueve diferentes ADNc han sido identificados en manzana cv Mutsu, de los cuales 8 comparten alta identidad nucleotídica que van desde 88% y un 96% entre sí (Nosarszewski y cols, 2004). En manzanas cv Fuji se han descrito cuatro isoformas de *SDH*, llamadas *MdSDH1*, 2, 3 y 4, las cuales comparten un 97% de identidad nucleotídica con las secuencias *SDH1*, 2, 3 y 9, respectivamente, descritas en la variedad Mutsu (Park y cols, 2002; Nosarszewski y cols, 2004).

Las cuatro isoformas descritas por Park y colaboradores (2002) fueron evaluadas en mayor profundidad, analizando sus propiedades bioquímicas y patrón de expresión. Estudios bioquímicos mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli* indicaron que *MdSDH2* y 3 catalizan la oxidación de sorbitol cuatro veces más que la reacción reversa, siendo la isoforma 3 la que presenta la mayor actividad enzimática registrada (0,70 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg proteína).

El análisis del patrón de expresión (Figura 3), indicó que las 3 isoformas son expresadas exclusivamente en órganos sumideros, mientras que *MdSDH1*, también registró una fuerte expresión en hojas maduras (órgano fuente). Cabe destacar que esta isoforma es la que presenta menor identidad nucleotídica con las otras *SDH* descritas en cv Mutsu y Fuji (~75%, Park y cols, 2002; Nosarszewski y cols, 2004). Durante el desarrollo del fruto, las cuatro isoformas evaluadas presentaron un patrón de expresión similar, en el cual la expresión de *SDH* se mantiene baja durante las etapas iniciales del desarrollo, pero sufre un fuerte incremento en las etapas tardías. En efecto, la actividad de *SDH* es alta durante la maduración, no sólo en frutos de manzanos, sino también en frutos de otros miembros de la familia Rosacea, incluyendo pera (Oura y cols, 2000) y durazno (Lo Bianco y cols, 1999).

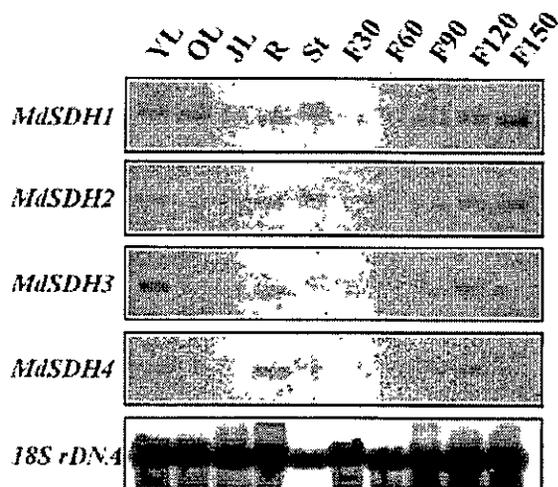


Figura 3: Expresión de las cuatro isoformas (*MdSDH1-4*) descritas en manzana cv Fuji en diferentes órganos y estadios en el desarrollo del fruto. Una sonda específica para cada gen fue usada para la hibridación en un *northern blot*. YL: hojas jóvenes, OL: hojas maduras, JL: hojas juveniles, R: raíces, St: tallo, F30-F150: fruto de 30-150 ddf. Tomado de Park y cols, 2002.

Por lo tanto, SDH es una enzima clave para la conversión de un azúcar de bajo poder edulcorante (sorbitol) a un azúcar de más del doble de dulzor (fructosa), y por ende juega un papel importante en incrementar naturalmente el dulzor de los frutos en su desarrollo. Esto la hace una excelente candidata para modular la composición de azúcares en el fruto mediante su sobre-expresión específica en este órgano, oxidando el sorbitol remanente que no es metabolizado durante el proceso de maduración (4 a 13 mg/gpf). En este contexto, la isoforma 3 descrita en manzanas cv Fuji (*MdSDH3*) ya caracterizada a nivel bioquímico, es una candidata adecuada para generar mediante transgénesis una nueva variedad de manzanos con frutos de mayor dulzor. En el presente seminario de título, se intentó aislar y clonar *MdSDH3*. Sin embargo se logró clonar el gen *MdSDH2*, isoforma que también presenta una alta actividad de oxidación sobre el sorbitol (Park y cols, 2002) y luego se evaluó la funcionalidad transcripcional de los vectores generados mediante la transformación génica transitoria de plantas.

1.3. Sobre-expresión fruto-específica de *SDH*

Para sobre-expresar un gen en un sistema vegetal, es importante la elección de un vector de expresión con un promotor adecuado que permita guiar su expresión en el tiempo y ubicación precisos.

Los vectores binarios pCambia han sido ampliamente utilizados para expresar de manera constitutiva genes en sistemas vegetales mediante su transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Hajdukiewicz y cols, 1994). En estos vectores, la expresión del gen de interés es controlada por el promotor fuerte y constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Sin embargo, la sobre-expresión de *SDH* en forma constitutiva disminuiría la concentración de sorbitol presente en todos los órganos, incluso en órganos fuentes reduciendo la tasa de suministro de carbono hacia los órganos sumideros. Esto podría traer como consecuencia el desarrollo de frutos de baja calidad y menor tamaño (Teo y cols, 2006). Para remediar este posible problema, un promotor fruto-específico dirigiría la expresión de *SDH* solamente en estos órganos. Un buen candidato es el promotor que controla la expresión del gen de la poligalacturonasa de tomate (PG; EC 3.2.1.15; Montgomery y col. 1993). Esta enzima participa en el proceso de maduración del fruto, digiriendo parcialmente la pectina de la pared celular, contribuyendo al ablandamiento de los tomates durante la maduración. Se ha determinado que 1,4 kb río arriba del extremo 5' del gen PG se abarcan todas las secuencias regulatorias que le dan la especificidad de expresión en el fruto (Bird y cols, 1988). Estudios posteriores determinaron que un fragmento truncado de 806 pb fue suficiente para expresar fuertemente un gen reportero con distribución homogénea en todo el fruto (Montgomery y cols, 1993).

Previamente en nuestro laboratorio, se obtuvo el vector pCambia-PG, al reemplazar la secuencia del promotor constitutivo (CaMV35S) en el vector binario pCambia1302 por el fragmento de 806 pb del promotor fruto-específico (PG; Mandujano, 2008). Esto ha permitido

disponer de un vector de expresión fruto-específica de genes en plantas, que producirán la expresión de dicho gen de forma homogénea en todo el órgano.

1.4. Transformación transitoria y estable de sistemas vegetales

Luego de identificar y clonar secuencias de interés, como *MdSDH2*, es necesario validar su función tanto a nivel molecular como bioquímico en modelos vegetales mediante un sistema de análisis rápido y efectivo. La generación de plantas transformadas de manera estable es un proceso de larga manipulación, que involucra usualmente más de un año para la regeneración, propagación y selección de transformantes. Como una alternativa a este sistema, la expresión y evaluación de genes foráneos en plantas es realizado por la transformación transitoria de células mediante *A. tumefaciens*, técnica denominada agro-infiltración (Yang y cols, 2000). A través de esta técnica, una porción del ADN plasmidial del vector binario (ADN-T) es introducido a las células hospedadoras por la bacteria, cuyos genes codificados son directamente transcritos y expresados sin la integración previa del ADN en el genoma de la planta, lo que permite disminuir enormemente el tiempo necesario para el estudio de genes de interés (Levy y cols, 2005). Tradicionalmente, la agro-infiltración ha sido realizada en hojas de plantas hospedadoras como tabaco (*Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana*). Sin embargo, una modificación de esta técnica ha sido descrita en otras especies vegetales, como son *Arabidopsis thaliana* y una gran variedad de frutos (tomate, durazno, manzana, plátano, entre otros; Spolaore y cols, 2001; Matsumoto y cols, 2009). En particular, frutos de tomate y duraznos han sido transformados transitoriamente mediante agro-inyección con el objetivo de evaluar complementación génica, análisis de promotores y producción de xenoproteínas con buenos resultados (Wroblewski y cols, 2005; Orzaez y cols, 2006; Caroca, 2007).

Luego de evaluar la funcionalidad de los vectores binarios construidos mediante transformación transitoria, el siguiente paso es implementar un sistema de transformación estable en plantas con el objetivo de generar una plataforma que permita la generación de nuevas variedades. El

objetivo principal del proyecto Innova-CORFO que enmarca el trabajo realizado durante el presente Seminario de Título es generar una nueva variedad de manzanos con mayor dulzor. Sin embargo, la transformación génica de manzanos es un proceso de larga manipulación que implica aproximadamente 4 años en ser implementado. Debido a esto, como una evaluación preliminar de los vectores de sobre-expresión realizados, es posible utilizar especies de características fenotípicas o fisiológicas similares, cuyo ciclo de vida sea más corto. En este contexto, el tomate resulta ser un buen candidato y modelo interesante para el estudio funcional de genes, lo cual es especialmente relevante para genes que se expresan en fruto.

Como modelo vegetal, la transformación estable de tomate ha sido descrita y desarrollada durante los últimos 25 años en distintas variedades, que incluyen Ailsa Craig, Marglobe, Rutgers, entre otras (McCormick y cols, 1986; Chyi y Phillips, 1987; Frary y Earle, 1996). Sin embargo, se ha descrito que el procedimiento de transformación de una variedad puede ser muy diferente al de otro cultivar dentro de la misma especie (Vasudevan y cols, 2007). Varios factores han sido considerados claves en la eficiencia de transformación, incluyendo tamaño y tipo de explante, medios utilizados, concentración y tipo de fitohormona suplementada, entre otros. En tomate, se ha reportado una alta eficiencia de transformación (~10%) utilizando explantes preparados según el método flamingo provenientes de cotiledones de 5 a 7 días de crecimiento luego de la germinación (Pozueta y cols, 2001; Saker y cols, 2008). Hace algunos años, el grupo del Dr. Patricio Arce (PUC, entidad colaboradora en el proyecto) ha implementado y estandarizado el sistema de transformación estable de tomate cv Ailsa Craig con gran éxito utilizando explantes preparados según este método. El presente Seminario de Título tuvo como uno de los objetivos implementar el sistema de transformación estable de tomate con el fin de sobre-expresar una *SDH* vegetal previamente caracterizada en tomate (*LeSDH*; Ohta y cols, 2005; Mandujano, 2008), para su posterior evaluación a nivel molecular.

1.5 Estrategia desarrollada

Como objetivos de este Seminario de Título y como primera parte en la evaluación de los genes *SDH* de plantas, se aisló el ADNc de una isoforma de *SDH* de manzanas y se construyeron dos vectores para su sobre-expresión en plantas, ambos basados en el vector binario pCambia 1302. En uno de los vectores generados, la expresión de *MdSDH* es controlada por el promotor constitutivo 35S (virus del Mosaico de la coliflor) y en el otro por el promotor PG (fragmento truncado de 806 pb). Posteriormente, *A. tumefaciens* fue transformada con estos vectores. Empleando la técnica de agro-inyección, se transformaron frutos de durazno en forma transitoria, con los vectores previamente nombrados. Por medio de RT-PCR se evaluó la expresión de *MdSDH* en los tejidos agro-inyectados de fruto, para evaluar la funcionalidad de los vectores construidos.

Paralelamente se implementó un sistema de transformación estable de tomate mediante organogénesis somática y *A. tumefaciens*, el cual permitirá evaluar tanto a nivel molecular como bioquímico SDHs vegetales con el objetivo de identificar cuál es la candidata apropiada para ser sobre-expresada fruto-específicamente en manzanos, y de esta manera generar una nueva variedad de manzana cv Fuji con frutos de mayor dulzor.

Dados los antecedentes expuestos, los objetivos de este Seminario de Título son:

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Desarrollo e implementación de herramientas biotecnológicas para sobre-expresar una sorbitol deshidrogenasa de manzanas (*MdSDH*) en plantas.

2.2. Objetivos Específicos

1. Aislar y clonar el ADNc de sorbitol deshidrogenasa (*MdSDH*) de manzanas, variedad Fuji. Se privilegiará la clonación de *MdSDH3* dado que de las dos isoformas caracterizadas (*MdSDH2* y *MdSDH3*), ésta posee mayor actividad enzimática.
2. Construir vectores binarios para sobre-expresar *MdSDH* en plantas de forma constitutiva y fruto-específica.
3. Análisis moleculares de frutos transformados transitoriamente con los vectores binarios de sobre-expresión de *MdSDH*.
4. Implementación de un sistema de transformación estable de tomate mediante organogénesis somática y *Agrobacterium tumefaciens*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para las técnicas empleadas de biología molecular y cultivo *in vitro* de plantas. Estos productos fueron fabricados principalmente por Fermentas, Promega, Invitrogen, Axygen, Merck y Phyto Technology Laboratories.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Obtención de frutos y hojas de manzano

Se utilizaron muestras de frutos y hojas de manzanos (*Malus x domestica* cv. Fuji) para llevar a cabo ensayos de purificación de ARN con el objetivo de aislar y clonar el ADNc correspondiente a la isoforma 3 de la sorbitol deshidrogenasa de manzana (*MdSDH3*).

Los frutos de manzana cv. Fuji fueron adquiridos comercialmente y seleccionados de acuerdo a su estado de maduración, el cual se caracterizó por presentar coloración rojiza, aromática y con fuerte resistencia a la presión. Las hojas de manzanos utilizadas correspondieron a la variedad Fuji N°2 455, suministrada en primavera por la empresa Univiveros®, Paine, RM. Fueron seleccionadas aquellas hojas en estadio temprano de crecimiento (1 a 3 cm de largo) las cuales, una vez cortadas desde el manzano fueron mantenidas en nitrógeno líquido, y posteriormente almacenadas a -80 °C.

3.2.2. Obtención de frutos de tomate y durazno para ensayos de expresión.

Para llevar a cabo ensayos de expresión mediante agro-inyección se utilizaron tomates hidropónicos inmaduros (*Solanum lycopersicum*) adquiridos comercialmente y seleccionados por presentar un exocarpo con coloración verdosa y/o amarilla, con fuerte resistencia a la presión.

Los frutos de duraznos (*Prunus pérsica* cv. *nectarina*) fueron adquiridos comercialmente. Ellos se encontraban en un estadio medio de maduración, presentando una epidermis lisa de color amarilla-rojiza (ausencia de color verde) con leve resistencia de la pulpa a la presión.

3.2.3. Obtención de semillas para transformación estable de tomate

Se utilizaron semillas de tomate de crecimiento determinado variedad San Pedro (Vilmorin®) para realizar transformación estable (sección 3.9) con vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica para la sorbitol deshidrogenasa de tomate (*LeSDH*; Mandujano, 2008).

3.2.4. Cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas

Se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 α con genótipo: *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* y de *A. tumefaciens* GV3101 con genótipo: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R.

3.3. TRABAJO CON BACTERIAS

3.3.1. Crecimiento de bacterias

Bacterias *E. coli* y *A. tumefaciens* (sección 3.2.4) fueron cultivadas durante 16 y 48 hr a 37 °C y 28 °C respectivamente, en medio LB líquido (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,8 % NaCl, pH 7.0 a 25 °C) y sólido (mezcla anterior suplementada con 1,5% de agar) a una agitación de 200-250 rpm para el caso del cultivo en medio líquido.

Los antibióticos de selección utilizados para *E. coli* fueron espectinomicina (100 mg/L) para las cepas transformadas con el vector de clonación pCR8 (sección 3.7.1) y kanamicina (100 mg/L) para las cepas transformadas con los vectores derivados de pCambia (sección 3.7.2.2). Para la selección de *Agrobacterium* transformada se utilizaron los antibióticos gentamicina (100 mg/L; resistencia otorgada por plásmido Ti), rifampicina (10 mg/L; selección cromosómica de la cepa) y kanamicina (100 mg/L; resistencia otorgada por los vectores pCambia).

3.3.2. Obtención de células *E. coli* quimiocompetentes

Para la generación de *E. coli* quimiocompetentes se utilizó el método de CaCl₂. Para esto, se realizó un pre-inóculo de cultivo (100 μ l de células) en 3 ml de LB líquido suplementado con ácido nalidíxico (100 mg/L). Luego, se diluyó el pre-inóculo en 100 ml de LB-ácido nalidíxico y se cultivó a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5 nm. Posteriormente, las células fueron

centrifugadas (10 min, 1600 x g, 4 °C), y el sedimento obtenido se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M. La mezcla fue centrifugada durante 5 min en las mismas condiciones mencionadas. Luego, se procedió a resuspender las células en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M e incubarlas en hielo por 30 min. Finalmente se centrifugaron las muestras (5 min, 1600 x g y 4 °C) resuspendiendo el sedimento formado en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y 600 µl de glicerol estéril. Alícuotas de células (200 µl) fueron almacenadas a -80 °C.

3.3.3. Transformación de *E. coli* por golpe térmico

A una alícuota de *E. coli* quimiocompetente (sección 3.3.2) descongelada en hielo, se le agregó 100-150 ng de la construcción de ADN deseada, incubando la mezcla en hielo durante 5 min. Luego, se incubaron las muestras a 42 °C durante 75 seg para volver a ubicarlas en hielo. Posteriormente, las células fueron incubadas en 1 ml LB (1 hr, 37 °C, 200-250 rpm) y sembradas en LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente (sección 3.3.1).

3.3.4. Obtención de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*

Para la generación de células de *Agrobacterium* quimiocompetentes, se dejó creciendo 5 ml de un cultivo suplementado con gentamicina y rifampicina (sección 3.3.1) en agitación durante 18 horas a 28 °C. Luego el inóculo fue vertido en 100 mL de LB líquido manteniendo las condiciones y las concentraciones de antibióticos mencionadas hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5 nm. Posteriormente, las células fueron mantenidas durante 10 min en hielo y centrifugadas (3000 x g, 20 min, 4 °C). Se resuspendió el sedimentado en 1 ml de CaCl₂ 20 mM estéril y frío. Alícuotas de células (100 µl) fueron almacenadas a -80 °C.

3.3.5. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por golpe térmico

A una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetente (sección 3.3.4) descongelada en hielo, se le adicionó 100-150 ng de la construcción de ADN de interés y luego se incubó por 5 min en nitrógeno líquido. Posteriormente, se descongeló la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min para luego ser incubada en medio LB a 28 °C durante toda la noche con agitación.

Finalmente, para la selección de los clones transformados, se sembraron las células en LB-agar suplementado con los antibióticos de selección (sección 3.3.1).

3.4. EXTRACCIONES DE ADN

3.4.1. Purificación de ADN plasmidial desde *Escherichia coli*.

Se utilizó ADN plasmidial purificado de manera alternativa con el fin de llevar a cabo análisis preliminares y, mediante kit comercial, para confirmar estos análisis con los clones de interés.

3.4.1.1. Método de purificación de ADN plasmidial alternativo.

Se realizó un cultivo líquido convencional de los clones de interés (5 ml de LB, sección 3.3.1). Una vez obtenido el cultivo, fue centrifugado (5.000 x g, 3 min) y se resuspendió el sedimento mediante agitación vigorosa con 100 µL de solución I fría (Glucosa 50 mM, Tris- HCl 25 mM y EDTA pH 8). Luego, se agregaron 200 µL de solución II (preparada en el momento: NaOH 0,2 N y SDS 1%), se mezcló por inversión 5 veces la muestra, manteniéndola en hielo durante 10 min. Posteriormente, se agregó 150 µL de solución III fría (Acetato de Potasio 5 M, Ácido Acético Glacial 11,5%, agua destilada 28,5%), se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 5 min. En seguida, la mezcla se centrifugó (12.000 x g, 5 min, 4 °C) y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga (1,5 ml). Se agregó un 50% del volumen recuperado de una mezcla de fenol: cloroformo (1:1), luego se mezcló vigorosamente y se centrifugó (12.000 x g, 2 min, 4 °C). El sobrenadante obtenido se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 min y luego se centrifugó (12.000 x g, 5 min, 4 °C). Posteriormente, se eliminó el sobrenadante con cuidado y se lavó el sedimento obtenido agregando 700 µL de etanol 70% frío. Luego de centrifugar la muestra (12.000 x g, 5 min, 4 °C) se eliminó el sobrenadante y se secó el ADN durante 5 min al vacío. Finalmente, se resuspendió el sedimento en 40 µL de agua NP y se trató con RNasa A (2 mg/ml, 30 min, 37 °C).

3.4.1.2. Método de purificación de ADN plasmidial mediante kit comercial

Para la extracción de ADN plasmidial desde colonias de *E. coli*, se dejó crecer en agitación durante 16 hr un cultivo de 5 mL con el antibiótico de selección correspondiente. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmidial utilizando el kit AxyPrep™ plasmid miniprep de Axygen Biosciences, según las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C. Con este ADN, se confirmaron los análisis de digestión, las reacciones de PCR y se utilizó para los procedimientos de transformación y secuenciación.

De forma excepcional se utilizó el kit comercial Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System de Promega para obtener mayor cantidad de ADN plasmidial de los vectores de expresión pCambia 35S-GFP y PG-GFP (sección 3.6.5.2).

3.4.2. Purificación de ADN plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens*

Para purificar el ADN plasmidial a partir de *A. tumefaciens*, se modificó el método alternativo de purificación plasmidial realizado para *E. coli* (sección 3.4.1.1). Se usó 10 ml de cultivo y se agregó un paso extra en el protocolo que involucró la incubación de la muestra, previamente tratada con solución l fría, con 20 µl de Lisozima (20 mg/ml) durante 15 min a 37 °C.

3.4.3. Purificación de ADN genómico desde plantas de tomate

Para la extracción de ADN genómico de tomates (sección 3.9) se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987). Con este fin, se molieron 100 mg de tejido en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido y 600 µL de tampón CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris-HCl 100 mM pH 8). La mezcla fue calentada (60 °C, 30 min), se agregó un nuevo volumen de tampón CTAB (400 µL) y se incubó a 70 °C durante 15 min. Posteriormente, se agregó 400 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (en proporción 24:1) y se mezcló por inversión 5 veces. Una vez disuelta la muestra, se centrifugó (15.000 x g, 10 min) y se transfirió el 70% del volumen de la fase superior a un nuevo tubo de microcentrífuga. Luego, a la fase acuosa recuperada se le agregó 700 µL de isopropanol de manera de precipitar el ADN. Esta mezcla se incubó a -20 °C durante 30 min y se centrifugó (15.000 x g, 10 min) para luego

descartar el sobrenadante. Al precipitado se le agregó 700 μ L de etanol 70% frío, se centrifugó (5 min, 15.000 x g) y se eliminó el sobrenadante. El ADN se secó a temperatura ambiente, durante 20 min y se resuspendió en 70 μ L de agua NP.

3.5. EXTRACCIONES DE ARN

3.5.1. Extracciones de ARN de frutos

El protocolo de extracción se basó en el método optimizado para purificar ARN total de alta calidad (Meisel y cols, 2005). Para cada muestra, se pesó 3 g de tejido del mesocarpo del fruto. En un mortero estéril se maceró el tejido en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino, el cual fue recolectado en un tubo falcón que contenía 10 ml de tampón de extracción (CTAB 2%, PVP (PM 360.000) 2%, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 N, espermidina trihidrocloruro 0,05%, β -mercaptoethanol 2%). La mezcla se incubó a 65 °C durante 15 min, agitándola vigorosamente 5 veces durante el proceso. Luego, se realizó una extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó (12.000 x g, 30 min, 4 °C). Se recuperó la fase acuosa resultante y se realizó una nueva extracción de la misma manera anteriormente descrita. La fase acuosa recuperada fue precipitada con 0.25 volúmenes de LiCl 10 M manteniendo la mezcla 24 hr a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra (12.000 x g, 40 min, 4 °C) para precipitar el ARN. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 500 μ L de tampón SSTE (NaCl 1 M, SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM) y transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga. La muestra fue sometida a una nueva extracción con igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y la fase acuosa se recuperó luego de centrifugar la muestra (14.000 x g, 10 min, 4 °C). La precipitación del ARN total se realizó añadiendo 2 volúmenes de etanol 100% pre-enfriado a la muestra e incubándola durante 30 min a -80 °C. Luego se prosiguió a centrifugar durante 20 min a 12.000 x g y 4 °C. El precipitado obtenido fue lavado con 500 μ L etanol 70% en agua DEPC, centrifugado (5 min, 12.000 x g, 4

°C), secado a temperatura ambiente y resuspendido en 30 µL de agua DEPC. Finalmente el ARN extraído fue guardado a -80 °C hasta el momento de su uso.

3.5.2. Extracciones de ARN de hojas

Para llevar a cabo la extracción de ARN total de hojas de manzano y tabaco, según corresponda, se utilizó el método de RNA-solv® de Omega Bio-tek (Chomczynsky y Sacchi, 2006). Las muestras (~100 mg de tejido) fueron congeladas en nitrógeno líquido, y posteriormente fueron maceradas en un mortero previamente esterilizado. Al polvo fino resultante, se le añadió 1 mL de RNA-Solv® Reagent, la mezcla se homogenizó y se transfirió a un nuevo tubo incubándola durante 15 min a temperatura ambiente. Posterior a esto, se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente cada muestra (15 seg) y se incubó en hielo (10 min). Luego, las muestras fueron centrifugadas (12.000 x g, 15 min, 4 °C) y la fase acuosa fue recuperada y transferida a un nuevo tubo. La precipitación del ARN fue realizada agregando 500 µL de isopropanol previamente enfriado a -20 °C e incubando las muestras a esta misma temperatura por 20 min. Luego, se centrifugó (10 min, 12.000 x g, 4 °C) y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Finalmente, el precipitado fue lavado con 1 ml de etanol al 80% en agua DEPC y posteriormente fue centrifugado (5 min, 12.000 x g, 4 °C), secado a temperatura ambiente y resuspendido en 30 µL de agua DEPC.

3.6. MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.6.1. Cuantificación y análisis de la calidad del ADN y ARN total

3.6.1.1. Visualización y cuantificación mediante geles de agarosa

Las muestras de ADN y ARN fueron visualizadas y analizadas en geles de agarosa de concentración variable (0,5% a 1,5%) según el tamaño del producto esperado. Como marcador de peso molecular se usó Gene Ruler™ (Fermentas®). Todos los geles fueron preparados con tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/ml. Las

muestras fueron mezcladas con tampón de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol 0.25% y glicerol 80%) en proporción 4:1 previo a ser cargadas en el gel. La electroforesis fue realizada a una diferencia de potencial entre 80 y 100 V durante 30 a 40 min para ADN y 60 V durante 20 min para ARN. De manera excepcional se realizaron electroforesis de ADN a 60 V durante 3 hr con el fin de separar y posteriormente purificar bandas de tamaños alrededor de 10 kb (sección 3.6.5.2). Los geles fueron visualizados con un trans-iluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene®) y las imágenes proporcionadas fueron evaluadas mediante Image J. Para determinar la integridad de ARN total (sección 3.5) se verificó la presencia de las bandas de ARNr de 28S y 18S.

3.6.1.2. Cuantificación y análisis de calidad mediante espectrofotómetro.

Todas las extracciones de ARN total (sección 3.5) y de ADN genómico de tomates (sección 3.4.3) fueron cuantificadas (A_{260}) y analizadas para constatar su pureza (razones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}) usando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). El valor de la relación A_{260}/A_{280} aceptada para extracciones puras de ADN y ARN debe estar cercano a 1.8 y 2.0, respectivamente, mientras que para la relación A_{260}/A_{230} los valores para muestras puras de ADN o ARN se encuentran en el rango de 1.8 y 2.2. Valores que se alejan a lo mencionado en ambos parámetros revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas.

3.6.2. Diseño de partidores específicos para la clonación de *MdSDH3*

Para el diseño de los partidores, se usó la secuencia con versión única del ARNm de la isoforma 3 de sorbitol deshidrogenasa de manzana (*MdSDH3*; Genbank acceso AF323506). La información entregada revela que el tamaño del ARNm es de 1521 pb, situándose el codón de inicio y de término de traducción en los nucleótidos 136 y 1242, respectivamente.

Se diseñó un partidor en sentido (*MdSDH-Spe5'*) compuesto por 18 nucleótidos que hibridan específicamente con *MdSDH3* incluyendo el codón de inicio, antecedido por la secuencia palindrómica de 6 nucleótidos del sitio de corte de *SpeI* (Tabla II).

Se diseñaron tres partidores antisentidos en el transcurso de este Seminario de Título (sección Resultados). El primero (MdSDH-Nhe3') se compone por 21 nucleótidos complementarios con *MdSDH3*, incluyendo el codón de término de la traducción, antecedido por la secuencia palindrómica de 6 nucleótidos del sitio de corte para la endonucleasa *NheI*. El segundo (MdSDH3'UTR), hibrida a partir del nucleótido 1470 en la región 3'UTR de *MdSDH3* antecedido por el sitio de corte *NheI*. Finalmente, el tercer partidor antisentido (MdSDH-Pml3') está compuesto por 21 nucleótidos, incluyendo el codón de término de la traducción, antecedidos por la secuencia de 5 nucleótidos correspondiente al sitio de corte como de *PmlI*. Cabe destacar que la secuencia codificante de *MdSDH3* no presenta sitios de corte para las endonucleasas seleccionadas. Se detallan las secuencias de todos los partidores en Tabla II.

3.6.3. Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Previamente a la reacción de RT-PCR, las muestras de ARN obtenidas (sección 3.5) fueron tratadas con DNasa para eliminar posibles remanentes de ADN producto de la extracción. Cada reacción se realizó con 1,5 µg de ARN total en un volumen de reacción de 10 µl en agua DEPC. La composición final de cada reacción fue: 1 x Tampón DNasa I con MgCl₂; 1 U DNasa I; 1,2 U de inhibidor de RNasa RiboLock™ (Fermentas). La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C, luego fue mantenida en hielo (5 min) y se agregó EDTA a una concentración final de 2,5 mM. Para la síntesis de ADN_c se utilizó el sistema ImProm-II® Reverse Transcription de Promega. Se mezcló 6,5 µl del volumen de ARN tratado con DNasa con 1,5 µM de partidor antisentido Oligo-AP o MdSDH3'UTR según sea el caso (sección 3.6.4, Tabla II). Se sometieron las muestras al programa RT-PCR el cual comienza con una incubación de 5 min a 70 °C. Transcurrido este tiempo se detuvo el programa momentáneamente para incubar los tubos en hielo (5 min) y se agregó 12,5 µL de la mezcla de transcripción reversa (1X tampón ImProm-II®, 10 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 1,5 U de inhibidor de RNasa RiboLock, agua DEPC). Finalmente, se añadió 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa a cada tubo. El programa continuó según lo detallado en Tabla I.

Se confirmó la integridad del ADNc obtenido utilizando el partidor Oligo-AP mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen de la subunidad ribosomal 18S utilizando partidores específicos y el programa del mismo nombre (Tabla I y II). Confirmada la integridad del ADNc, se realizó un PCR para amplificar el fragmento de interés (sección 3.6.4 y 3.8.2).

3.6.4. Reacciones de PCR

3.6.4.1. Amplificación del ADNc de *MdSDH3* mediante PCR

La reacción de PCR realizada con el objetivo de amplificar el ADNc de *MdSDH3* utilizó como molde el producto obtenido mediante RT-PCR utilizando el partidor antisentido Oligo-AP o *MdSDH3*'UTR, según corresponda (sección 4.1.1 y 4.1.2). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l utilizando la enzima Pfu polimerasa, la cual exhibe actividad exonucleasa en sentido 3'→5' impidiendo la incorporación de nucleótidos erróneos durante la polimerización. La mezcla contenía 1 X tampón de reacción suplementado con $MgSO_4$, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M de los partidores sentido y antisentido, 2 μ l de molde sin diluir (ADNc total) y 1 U de Pfu polimerasa recombinante (Fermentas). Como control negativo de reacción se usó una muestra de ARN previamente tratada con DNAsas. El programa de reacción utilizado se detalla en Tabla I, con el nombre *MdSDH* clonación.

El protocolo general para las otras reacciones de PCR realizadas utilizó la enzima Paq DNA polimerasa de Stratagene debido a su mejor rendimiento. La mezcla general se compuso de la siguiente manera: 1X tampón de reacción Paq5000™, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M de los partidores sentido y antisentido, 1 U de Paq polimerasa, ADN como molde y agua nanopura suficiente para completar un volumen final de reacción de 20 μ L.

Tabla I. Programas de PCR utilizados para el desarrollo de este Seminario de Título

MdSDH clonación: Programa de PCR usado para la amplificación del ADNc correspondiente a *MdSDH3* mediante Pfu polimerasa usando el partidor en sentido MdSDH-Spe5' y los antisentido MdSDH-Nhe3' o MdSDH-PmlI3'.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	40 seg	36
	2	53	1 min 30 seg	
	3	72	2 min 30 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

MdSDH chequeo: Programa de PCR usado para la amplificación de *MdSDH3* mediante Paq polimerasa a partir de colonias transformadas de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas con los vectores pCR8-MdSDH y 35S/PG-MdSDH respectivamente, usando el partidor sentido MdSDH-Spe5' y los antisentido MdSDH-Nhe3' o MdSDH-PmlI3'.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	40 seg	38
	2	53	1 min 30 seg	
	3	72	45 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

Dirección inserto: Programa de PCR usado para la amplificación del fragmento 35S-MdSDH (usando partidor sentido 35S F y los antisentido MdSDH-Nhe3' o MdSDH-PmlI3') o el fragmento PG-MdSDH (usando partidor sentido PG-BamHI-F y los antisentidos MdSDH-Nhe3' o MdSDH-PmlI3').

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	94	5 min	1
2	1	94	40 seg	38
	2	51	1 min 10 seg	
	3	72	1 min 15 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

18S / Higo: Programa de PCR utilizado para comprobar la integridad del ADNc mediante la amplificación de una parte de la subunidad ribosomal 18S usando partidores 18S5' y 18S3' y para confirmar la transformación estable de tomate a través de la amplificación de una fragmento del gen *hptII* usando partidores HigoF e HigoR.

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	1	95	5 min	1
2	1	95	40 seg	35
	2	50	1 min	
	3	72	30 seg	
3	1	72	10 min	1
		10	∞	

RT-PCR: Programa para obtener ADNc mediante transcriptasa reversa usando partidores Oligo-AP y MdSDH3'UTR, según corresponda (sección resultados).

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	70	5 min
	2	hielo	7 min
2	1	25	5 min
	2	42	60 min
	3	70	15 min
3	1	4	∞

Tabla II. Partidores utilizados en este Seminario de Título.

Partidor	Secuencia Partidor (5' → 3')	Descripción
MdSDH-Spe5'	GGCAACTAGTAAAATGGGCAAGGGAGGC	Diseñados para amplificar el ADNc de <i>MdSDH3</i> . Poseen respectivamente el sitio de corte para <i>SpeI</i> (partidor en sentido) y <i>NheI</i> (partidor antisentido) subrayados e incluyen el codón de inicio y de término de traducción (destacados en rojo). Juntos amplifican un fragmento de 1107 pb (<i>MdSDH3</i>).
MdSDH-Nhe3'	GGCAGCTAGCATTACTATAGATTAACATG	
MdSDH3'UTR	GGCAGCTAGCATTACATGCATACGTACGC	
MdSDH-PmlI3'	GGCACACGTGGATTACTATAGATTAA ACATG	Partidor antisentido diseñado para amplificar <i>MdSDH3</i> . Posee sitio de corte para <i>PmlI</i> (subrayado) y el codón de término de traducción (rojo). Junto con MdSDH-Spe5 amplifican <i>MdSDH3</i> (1107 pb)
18S 5'	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Partidores utilizados para verificar la integridad tanto del ADN genómico como del ADNc. Amplifican un fragmento de 196 pb del gen para el ARN ribosomal 18S.
18S 3'	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	
35S F	AGAACTCGCCGTAAAGACTG	Partidor en sentido utilizado para verificar la orientación de clones 35S-MdSDH. Hibrida con el promotor CaMV 35S presente en pCambia 1302 y junto con MdSDH-PmlI3' o MdSDH-Nhe3' amplifican un fragmento de 1602 pb (35S-MdSDH3).
PG-BamHI- F	GGATCCTAAGTACCATCACATAATTGAGA	Partidor en sentido utilizado para verificar la orientación de clones PG-MdSDH. Posee sitio de corte para BamHI (subrayado). Hibrida con el promotor PG presente en pCambia PG-GFP y junto con MdSDH-PmlI3' o MdSDH-Nhe3' amplifican un fragmento de 1918 pb (PG-MdSDH).

Higro F Higro R	TTTGTGTACGCCGACAGT AAGACCTGCCTGAAACCGA	Partidores en sentido (F) y en antisentido (R) diseñados para amplificar un fragmento interno de 500 pb del gen que codifica resistencia a Higromicina (<i>hptII</i>).
Oligo-AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT	Partidor en antisentido utilizado en reacciones de RT-PCR
M13 F M13 R	GTA AACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	Partidores utilizados para secuenciar las construcciones pCR8-MdSDH
GFP5' GFP3'	GAGGGTGAAGGTGATGCAAC CAGGTAATGGTTGTCTGG	Partidores utilizados para verificar la digestión parcial (sección 6.5.2). Juntos amplifican un fragmento interno de 510 pb de <i>GFP</i> .

3.6.4.2. Reacción de PCR de colonia

El PCR de colonia es una variante del PCR tradicional en que se usa como molde el cultivo de bacterias directamente. Se analizaron las colonias de *E. coli* transformadas con las construcciones pCR8-MdSDH, PG-MdSDH y 35S-MdSDH mediante este método. En el caso de las colonias de *A. tumefaciens*, se confirmaron que portaran las construcciones PG-MdSDH y 35S-MdSDH. La reacción de PCR se realizó mediante el protocolo general detallado en la sección anterior. Como control negativo se utilizó agua NP en vez del cultivo bacteriano y como control positivo ADN plasmidial de la construcción correspondiente.

3.6.5. Digestiones enzimáticas

3.6.5.1. Digestiones enzimáticas para la selección de clones positivos

Para confirmar la identidad y orientación de *MdSDH* en los vectores pCR8-MdSDH, 35S-MdSDH y PG-MdSDH se realizaron ensayos de restricción con la endonucleasa *BstEII* (Eco911, Fermentas). Esta enzima corta una vez en la secuencia codificante de *MdSDH* (nucleótido 303), en el vector de clonamiento pCR8 (nucleótido 1442) y en los vectores de expresión 35S-GFP y PG-GFP (nucleótido 760, extremo 3' de la secuencia *GFP*). En el caso de los vectores de expresión 35S-MdSDH y PG-MdSDH el ensayo de restricción permitió además corroborar la ausencia de *GFP*. La mezcla para cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl que

contenía 1X tampón 0, 1 U de enzima *BstEII* y 500 ng de ADN plasmidial. Todas las reacciones de digestión fueron incubadas a 37 °C durante aproximadamente 2 hr.

3.6.5.2. Digestión doble de los vectores de clonación y expresión con las endonucleasas *SpeI* y *NheI*, mediante digestión parcial.

El vector de clonación (pCR8-MdSDH) fue digerido con las enzimas *SpeI* y *NheI* (Fermentas) mediante una mezcla de reacción que contenía 1X Tampón Tango, 1 U de cada enzima y 800 ng de ADN plasmidial. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 hr. No fue posible seguir esta metodología con los vectores de expresión utilizados (pCambia 35S-GFP y PG-GFP) por la presencia de un sitio de corte extra para la enzima *NheI* en su secuencia. Debido a esto, se realizó una digestión parcial con el fin de lograr aislar el fragmento correspondiente a sólo un corte de la enzima *NheI*. Para esto, ambos vectores de expresión fueron linealizados con *SpeI* (2X Tampón Tango, 1 U de *SpeI* y 800 ng de ADN plasmidial), e incubados a 37 °C durante 2 hr. Transcurrido este tiempo, se agregó 1 U de *NheI*, la cual fue mantenida a 37 °C durante 10 min, para finalizar con la inactivación de las enzimas (65 °C, 20 min). Los productos de la digestión parcial fueron visualizados en geles 0,5% agarosa (sección 3.6.1.1) y luego purificados mediante kit comercial (sección 3.6.6).

3.6.5.3. Digestión doble de los vectores de clonación y expresión con las endonucleasas *SpeI* y *PmlI*

El vector de clonación pCR8-MdSDH y los vectores de expresión pCambia 35S-GFP y PG-GFP fueron digeridos utilizando una mezcla de reacción que contenía 1X Tampón Tango, 1 U de cada enzima y 800 ng de ADN plasmidial. Cada reacción se incubó a 37 °C durante aproximadamente 4 hr.

3.6.6. Purificación de ADN desde geles de agarosa

Fragmentos de ADN de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante el kit de purificación de ADN desde geles Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System de Promega.

3.6.7. Secuenciación

La secuenciación de los ADN plasmidiales fue realizada en Macrogen Co. (USA), usando los partidores M13F y M13R (Tabla II, sección 3.6.4).

3.7. CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

3.7.1. Clonamiento de *MdSDH* por el sistema pCR[®]8

El sistema pCR[®]8/GW/TOPO[®] de Invitrogen permite clonar productos de PCR que contengan en su extremo terminal 3' deoxyadenosina (A) debido al apareamiento de bases que ocurre con la timina desapareada que posee el vector en su sitio de clonamiento. Además, este vector de 2,8 kb cuenta con una enzima del tipo topoisomerasa unida a sus extremos la cual liga ambos ADN (vector e inserto) de forma muy eficiente.

Para utilizar este sistema, fue necesario agregar en forma previa una adenina terminal en los extremos 3' del producto de PCR correspondiente a la amplificación de *MdSDH3* mediante Pfu polimerasa (sección 3.6.4.1) y purificado desde geles de agarosa (sección 3.6.6). Con este objetivo, se realizó una mezcla que contenía: 1X tampón NH₄, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dATP, 0,5 U de Taq ADN polimerasa Biolase (Bioline) y 150 ng de producto PCR purificado. La mezcla se incubó a 72 °C durante 30 min.

Obtenido el inserto, se realizó la reacción de ligación con el vector pCR8 en una mezcla que contenía 1 µl de vector y de solución salina según lo recomendado por sus fabricantes, en un volumen final de 6 µl. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 hr y luego se transformó *E. coli* (sección 3.3.3). Los clones resistentes a espectinomicina fueron analizados mediante ensayos de PCR (3.6.4.1), digestiones enzimáticas (3.6.5.1) y finalmente por secuenciación (3.6.7) para confirmar la fidelidad del inserto clonado.

3.7.2. Construcción de vectores de sobre-expresión de *MdSDH* en plantas

3.7.2.1 Vectores binarios de sobre-expresión utilizados

Para la construcción de vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica de *MdSDH* en plantas, se utilizaron los vectores binarios pCambia 1302 (35S-GFP) y pCambia 1302 modificado (PG-GFP), respectivamente.

En el vector binario elegido, pCambia 1302, se encuentra clonado el promotor fuerte y constitutivo del virus mosaico de la coliflor (35S) controlando la expresión del gen reportero que codifica para la proteína fluorescente verde (mGFP5). Este vector binario contiene una secuencia de selección en bacterias (kanamicina^R, *nptII*). El ADN de transferencia (ADN-T) está flanqueado por las secuencias T-borde izquierdo y T-borde derecho e incluye el gen de resistencia a higromicina (higromicina^R, *hptII*) controlado por el promotor constitutivo doble 35S para la selección de plantas transformadas.

Debido al trabajo de Seminario de Título realizado por Patricio Mandujano en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Universidad de Chile) se dispone del constructo pCambia 1302 modificado de expresión fruto-específica (PG-GFP). En este vector se reemplazó la secuencia del promotor 35S que controla la expresión de GFP por la secuencia promotora del gen de la poligalacturonasa de tomate (número de acceso NCBI: X07410; Montgomery y cols, 2003). Su funcionalidad fue re-evaluada mediante microscopía (sección 3.8.1)

3.7.2.2 Construcción de vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica de *MdSDH*

Para elaborar los vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica de *MdSDH* en plantas, se desarrollaron dos estrategias. Ambas metodologías consideraron una digestión doble de los vectores 35S-GFP, PG-GFP y pCR8-MdSDH con las mismas enzimas de restricción con el objetivo de ligar los fragmentos correspondientes a través de extremos compatibles. En el caso de los vectores de expresión 35S-GFP y PG-GFP la digestión doble

tuvo como fin la escisión de la secuencia codificante *GFP*, para ser reemplazada posteriormente con la secuencia *MdSDH* previamente digerida a partir del vector de clonación pCR8-MdSDH.

La **primera estrategia de clonación** consideró utilizar las enzimas de restricción *SpeI* y *NheI* para llevar a cabo la digestión doble de los tres vectores (sección 3.6.5.2). Como **segunda estrategia de clonación**, se reemplazó la enzima *NheI* por la endonucleasa *PmlI* en la digestión doble de los tres vectores (sección 3.6.5.3). Con este objetivo fue necesario amplificar el ADNc de *MdSDH* con el partidor reverse MdSDH-PmlI3' (sección 3.6.2.3) que confirió tal sitio de corte en el extremo 3' de *MdSDH*.

Los fragmentos esperados fueron purificados a partir de geles de agarosa (sección 3.6.6) y cuantificados mediante Image J (3.6.1.1).

La ligación de los fragmentos obtenidos se llevó a cabo utilizando ADN T4 ligasa (Promega). Cada mezcla de reacción contenía 150 ng del vector de expresión purificado, 50 ng de inserto, 1X tampón ligasa y 1 U de la enzima ADN T4 ligasa. Las mezclas fueron incubadas a 17 °C, durante 16 hr. Luego se procedió a transformar *E. coli* (sección 3.3.3). Las colonias crecidas en medio de selección fueron evaluadas mediante la amplificación de *MdSDH* y *GFP* (sección 3.6.4.2) para descartar clones que contuvieran la construcción 35S/PG-MdSDH-GFP. Mediante PCR del fragmento promotor-gen se evaluó la orientación del inserto, utilizando los partidores en sentido 35S F y PG-BamHI-F y el partidor antisentido MdSDH 3' según corresponda (MdSDH-PmlI3' o MdSDH-Nhe3'; Tabla II) usando el programa de PCR llamado "Dirección inserto" (Tabla I). Se realizó un stock de glicerol de los clones positivos. Adicionalmente, para analizar la orientación del inserto en los vectores de expresión se realizaron ensayos de restricción con *BstEII* (sección 3.6.5.1). Clones positivos para todos los análisis mencionados fueron llamados 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Con estos clones se procedió a transformar *A. tumefaciens* (sección 3.3.5). Colonias resistentes a kanamicina fueron evaluadas mediante PCR de colonia y finalmente por PCR tradicional a partir de ADN purificado (sección 3.4.2).

3.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

3.8.1. Transformación transitoria de frutos y hojas

Los clones de *A. tumefaciens* portadores de los vectores PG-MdSDH o 35S-MdSDH fueron crecidos en medio LB líquido suplementado con los antibióticos de selección (sección 3.3.1) hasta alcanzar $D.O_{600}$ cercana a 0,8. Las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación (5000 x g, 5 min) y se resuspendieron hasta una densidad óptica de 1 en medio de infiltración (MMA) compuesto por 0,5 X MS, MES 10 mM (pH 5,6), sacarosa 20 g/L y acetosiringona 200 μ M. La suspensión obtenida se usó para agro-inyectar frutos de durazno (Spolaore y cols, 2001) o tabaco (Norambuena y cols, 2005). En el caso de frutos, se usó jeringas BD ultra-fine™ II (capacidad 300 μ L) con aguja de 8 y 3 mm. Cada fruta se transformó transitoriamente con un constructo distinto, agro-inyectando suavemente 800 μ L de suspensión a 3-4 mm de profundidad con el fin de minimizar el daño en el fruto. Para la transformación de hojas de tabaco, éstas fueron previamente asperjadas con agua para facilitar el proceso de infiltración. La suspensión bacteriana fue recogida mediante una jeringa sin aguja (BD de 1 ml) y ésta se presionó contra el envés de la hoja de manera que la suspensión perfundió el órgano. Como control negativo de transformación, se agro-inyectaron frutos y hojas de tabaco con *A. tumefaciens* cepa GV3101.

Los frutos y hojas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días (Orzaez y cols, 2006). Transcurrido este tiempo, se cosecharon las muestras agro-inyectadas y se les extrajo su ARN según como se detalla en secciones 3.5.1 (frutos) y 3.5.2 (hojas). A partir de ADNc total se amplificó mediante PCR la secuencia de *MdSDH* con el objetivo de corroborar la funcionalidad transcripcional de los vectores construidos (sección 3.6.4.1).

3.8.2. Microscopía de fluorescencia.

El análisis de la funcionalidad del promotor PG se realizó verificando la expresión de *GFP* en tejido transformado transitoriamente con el vector pCambia PG-GFP. Mediante *A. tumefaciens* transformada con este vector (sección 3.3.5), se agro-infiltró hojas de tabaco y se agro-inyectó

frutos de tomate. Luego de 4 días de incubación a temperatura ambiente, se realizaron cortes muy finos del tejido infiltrado de hojas y frutos. Estas muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70) utilizando una longitud de onda de 488 nm (luz azul, requerida para excitar a GFP). Como control negativo se utilizaron muestras infiltradas con *A. tumefaciens* sin transformar (sección 3.2.4) y como control positivo se usó muestras transformadas con pCambia 1302 (35S-GFP).

3.9. CULTIVO *IN VITRO* Y TRANSFORMACIÓN DE TOMATES

3.9.1. Cultivo *in vitro*: Esterilización y sembrado de semillas de tomate

Para la transformación estable de tomate, se utilizaron explantes de plántulas cultivadas *in vitro*. Para llevar a cabo el cultivo *in vitro*, se esterilizaron semillas de tomate (sección 3.2.3) durante 2 min en agitación con una solución de 70% etanol. Luego de decantar el líquido, se traspasaron las semillas a una solución de hipoclorito de sodio (5%) y Tween 20 (50 mM) donde se mantuvieron en agitación durante 20 min. Después se descartó el líquido, se lavaron las semillas 5 veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua mediante papel absorbente previamente autoclavado. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en placas con medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962). Las placas se mantuvieron en oscuridad a 25 °C durante 24 hr, para luego ser ubicadas bajo fotoperíodo (25 °C, 16 horas luz, 2400 lux)

3.9.2. Obtención de explantes de tomate tipo Flamingo

Plántulas de tomate regeneradas transcurridos 7 días luego de su germinación fueron colocadas en placas de petri estériles con una cantidad suficiente de agua destilada. En condiciones de esterilidad los explantes de tomate fueron preparados según método "flamingo" (Saker y cols, 2007; Pozueta y cols, 2001) removiendo una de las hojas y el brote meristemático desarrollado entre ambos cotiledones. El resto de la planta que incluye raíces, hipocotilo y una hoja del cotiledón constituyó el explante blanco para su posterior transformación.

3.9.3. Transformación de explantes tipo Flamingo mediante *A. tumefaciens*

Cultivos de *A. tumefaciens* portadores de PG-LeSDH o 35S-LeSDH fueron crecidos (sección 3.3.1) hasta alcanzar un $D.O_{600}$ 0.6 y luego centrifugados (3.000 x g, 5 min). El sedimentado fue resuspendido mediante agitación suave (150 rpm) en 20 ml de medio de co-cultivo líquido (Medio B sin agar, Tabla III). Se mantuvieron los explantes tipo flamingo durante 30 min en esta solución. Transcurrido este tiempo, se secaron los explantes con papel estéril y se sembraron en medio de co-cultivo sólido (Medio B, Tabla III) durante 48 horas en oscuridad a 25 °C.

3.9.4. Regeneración de explantes de tomate mediante organogénesis somática.

Luego de 48 horas en medio de co-cultivo sólido, los explantes fueron transferidos a placas petri con medio C (Tabla III), y transferidos semanalmente a medio fresco durante 6-7 semanas.

Se realizaron dos controles de transformación: el control positivo consistió en explantes tipo "flamingo" transferidos directamente a medio C (sin antibiótico higromicina), mientras que para el control negativo, explantes sin haber sido co-cultivados con *Agrobacterium* transformada, fueron sembrados en medio C suplementado con higromicina.

Brotos verdes bien formados de 1 cm de altura fueron transferidos a frascos de vidrio con medio de elongación (medio D, Tabla III) y transferidos semanalmente a medio fresco durante 4-6 semanas. Cuando los brotes alcanzaron los 4 cm de alto, sin generar raíces, fueron transferidos a un medio de enraizamiento (Medio E, Tabla III) hasta observar el desarrollo de éstas.

Luego de 5 meses, se obtuvieron plántulas de tomate con raíces apropiadas para su aclimatación a tierra. Para el cultivo en invernadero, se trasplantaron las plántulas cultivadas *in vitro* a maceteros de 1200 cm³ con una mezcla de tierra de hoja: vermiculita (2:1) y condiciones de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad a una temperatura constante de 24 °C. Para la aclimatación de las plantas, éstas inicialmente fueron cubiertas con un vaso plástico provisto de pequeños agujeros en su parte superior, con el fin de mantener la alta humedad a la que fueron sometidas durante su cultivo *in vitro*. Luego de 2 semanas, se comenzaron a destapar las plantas gradualmente, para finalmente destaparlas por completo en un período de 2 meses.

3.9.5. Análisis mediante PCR para confirmar plantas de tomate transgénicas

Para determinar la inserción estable en el genoma de tomate de las construcciones de sobre-expresión (35S-LeSDH y PG-LeSDH) se amplificó parte del gen que confiere resistencia a higromicina mediante PCR. Se extrajo ADN genómico de tomates silvestres y transformantes (sección 3.4.3) y se utilizó el programa denominado Higo (Tabla I) y los partidores HigoF e HigoR (Tabla II). Como control negativo se utilizó ADN de tomate silvestre y como controles positivos, se usó como molde ADN genómico de tabaco transgénico con resistencia a higromicina (evaluado previamente, G4Pr::GUS; Ampuero, 2010) y ADN plasmidial del vector 35S-LeSDH.

Tabla III: Composición Medios de Cultivo *in-vitro* de tomate

Medio Composición (L)	Medio de germinación (A)	Medio de co- cultivo (B)	Medio de Inducción y regeneración de brotes (C)	Medio de Elongación (D)	Medio de enraizamiento (E)
MS sales (g)	4,42	4,42	4,42	4,42	2,15
Mio inositol (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sacarosa (g)	30	30	30	15	15
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Agar (g)	7	7	7	7	7

Mix vitaminas* (ml de 1000x)	-	1	1	1	1
BAP* (mg)	-	-	1	-	-
IBA* (mg)	-	-	0,1	-	5
Acetosiringona* (μ M)	-	200	-	-	-
Carbaniclina* (mg)	-	-	300	300	300
Higromicina* (mg)	-	-	2,5	2,5	2,5
PPM* (ml)	-	-	3	3	3

* Estos reactivos fueron esterilizados mediante ultra-filtración, y agregados al resto de los componentes luego de que ellos habían sido esterilizados mediante autoclave.

4. RESULTADOS

4.1. Clonación del ADNc de *MdSDH* en un vector bacteriano

4.1.1. Primer intento de clonación del ADNc de *MdSDH3*

La mayor expresión de *MdSDH3* en manzanos *cv. Fuji* se ha reportado en hojas jóvenes y frutos maduros (Park y cols, 2001). Debido a su mayor disponibilidad, como primer intento para clonar *MdSDH3* en un vector bacteriano se adquirió comercialmente frutos de manzana variedad Fuji. A partir de estos frutos en estado maduro, se extrajo ARN total (sección 3.5.1). Por electroforesis, se observaron las bandas correspondientes a ARN ribosomal 28S y 18S (Figura 4; Chomczynski, 2006) en las dos muestras obtenidas de ARN, y mediante espectrofotometría, se determinó que eran de alta pureza y concentración ($A_{260}/A_{280} \sim 2,0$; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

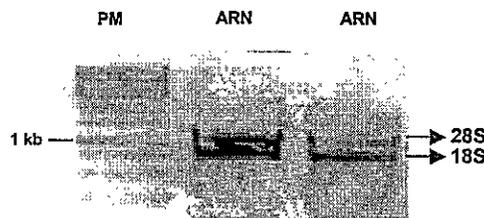


Figura 4: Determinación de la integridad del ARN extraído de frutos de manzana. Gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio muestra las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S en las 2 extracciones realizadas (ARN frutos 1 y 2). PM: estándar de peso molecular.

Ambas muestras de ARN fueron tratadas con DNAsas (sección 3.6.3) con el fin de descartar posibles remanentes de ADN que pudiesen intervenir con los resultados. El ARN tratado fue utilizado como molde en reacciones de RT usando el partidor antisentido Oligo-AP. Para evaluar la calidad del ADNc generado, se amplificó con éxito para cada muestra un fragmento de 196 pb del gen de expresión constitutiva de la subunidad ribosomal 18S (Figura 5A). Luego de verificar la calidad de las muestras obtenidas, se amplificó mediante PCR el ADNc de *MdSDH3* utilizando partidores específicos (*MdSDH-Spe5'* y *MdSDH-Nhe3'*, Tabla II) y condiciones de reacción previamente estandarizadas (sección 3.6.4.1). A partir de una de las muestras de ADNc, se logró amplificar un fragmento de 1135 pb correspondiente al tamaño esperado para *MdSDH3*, tamaño que incluye los 29 nucleótidos agregados a la secuencia por

los partidores utilizados (Figura 5B). Como control positivo y negativo para la reacción de PCR, se usó como molde el ADN genómico de manzana y el ARN tratado con DNAsas, respectivamente. En la Figura 5, el fragmento amplificado para el control positivo es ligeramente mayor al tamaño observado para el ADNc de *MdSDH3*, debido a la presencia de intrones en la secuencia genómica de *MdSDH3* (~120 pb; Nosarszewski y cols, 2001). El control negativo evidencia que las muestras no contenían remanentes de ADN genómico posterior al tratamiento con DNAsas.

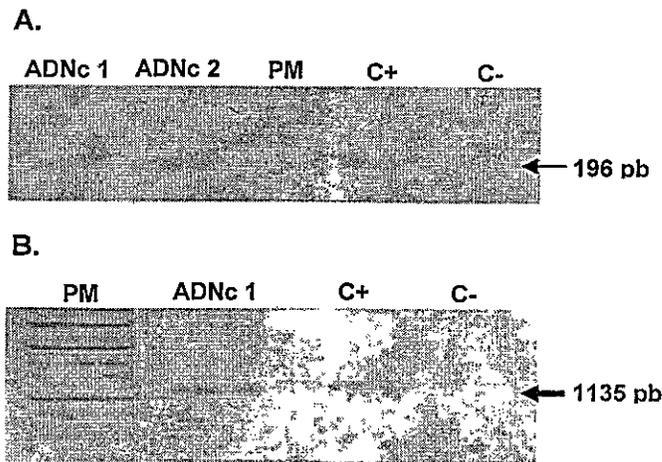


Figura 5. Amplificación del gen *18S* y *MdSDH3* a partir de ADNc de manzana. A: Amplificación de un fragmento de 196 pb del gen *18S* como control de calidad de las muestras de ADNc obtenidas producto de la reacción de transcripción reversa. **B:** Amplificación de *MdSDH3* a partir de una de las muestras de ADNc (ADNc 1). Se observa la banda de 1135 pb correspondiente al tamaño esperado. En ambos casos se usó ADN genómico de manzana como control positivo (C+) y una muestra de ARN previamente tratada con DNAsas como control negativo de reacción (C-). **PM:** estándar de peso molecular.

La banda de 1135 pb observada mediante electroforesis fue purificada desde geles de agarosa para ser ligada en el sistema de clonación pCR8, transformando posteriormente *E. coli* cepa *DH5 α* . Las colonias que crecieron en el medio de selección (espectinomomicina) fueron analizadas mediante la amplificación de *MdSDH3* por PCR de colonia (sección 3.6.4.2). El ensayo indicó que 7 de las 10 colonias analizadas contenían la construcción pCR8-*MdSDH3* (datos no mostrados). Estos resultados fueron confirmados mediante una segunda reacción de PCR en la cual se utilizó ADN plasmidial como molde (Figura 6).

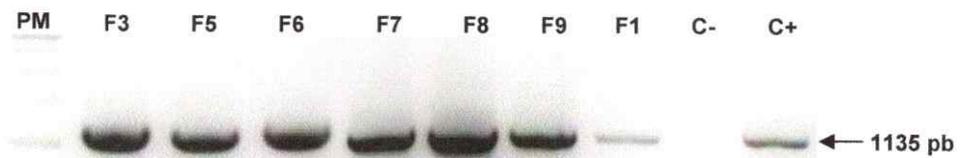


Figura 6. Amplificación de *MdSDH3* a partir de ADN plasmidial de clones positivos seleccionados previamente por PCR de colonia. En gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se observa la banda de 1135 pb correspondiente al tamaño esperado para *MdSDH3* en los 7 clones seleccionados. Como control positivo de reacción (C+) se utilizó la muestra de ADNc.1, y como control negativo (C-) se reemplazó el volumen de molde por agua NP. **PM:** estándar de peso molecular.

La presencia y orientación del inserto en el vector fue también corroborado a través de ensayos de restricción con la enzima *BstEII*. Debido a que la estrategia de clonación posterior es mediada por sitios de restricción, la orientación del inserto en pCR8 no es determinante, por lo tanto, esta información fue considerada sólo como una forma de verificar la identidad y presencia del inserto en el vector. Como se observa en Figura 7, los 7 clones seleccionados a partir de PCR presentaron el patrón esperado de inserción en sentido o antisentido de la secuencia de *MdSDH3* en el vector pCR8.

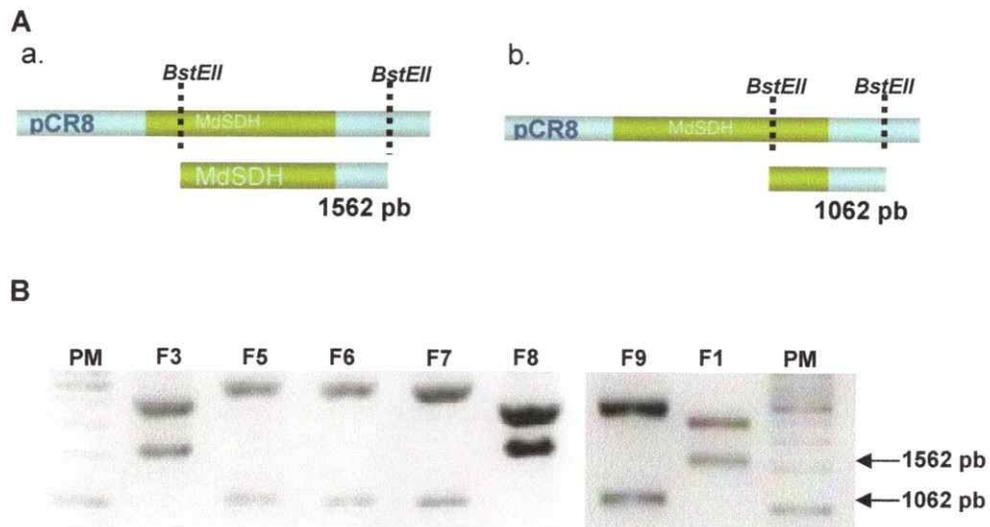


Figura 7. Digestión enzimática de pCR8-MdSDH3 con *BstEII*. **A:** Esquema de digestión para *MdSDH3* ligada en sentido (a) y antisentido (b) en pCR8 con sus respectivos tamaños esperados. **B:** En gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio se observan las bandas de 1562 pb y 1062 pb esperadas para el patrón de digestión con *BstEII*. De los 7 clones previamente seleccionados por PCR, 3 presentan *MdSDH3* ligado en sentido (F3, F8, F1) y 4 en antisentido en el vector de clonación. **PM:** estándar de peso molecular.

Se seleccionó uno de los clones arbitrariamente (clon F5) y se secuenció su ADN plasmidial utilizando los partidores M13F y M13R (Tabla II). La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia de *MdSDH3* (AF323506). El alineamiento entre ambas secuencias dio como resultado un 92% de identidad a nivel nucleotídico y un 93% de identidad a nivel aminoacídico. Análisis bioinformáticos revelaron que la secuencia clonada compartía mayor identidad nucleotídica con la isoforma 2 de *SDH* en manzanas cv. Mutsu (Tabla IV, Nosarszewski y cols, 2001).

Tabla IV: Porcentajes de identidad a nivel nucleotídico obtenidos a partir del alineamiento de la secuencia para el clon F5 con isoformas descritas para *SDH* en manzanos. Secuencias nucleotídicas de *SDH* de manzanos cv. Mutsu (*MdSDH2*; AY244807) y cv. Fuji (*MdSDH2*; AF323505, *MdSDH3*; AF323506), fueron alineadas con la secuencia obtenida para el clon F5 mediante la herramienta bioinformática ClustalW.

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 ClonF5	1107	2 MdSDH2cv.Mutsu	1107	99
1 ClonF5	1107	3 MdSDH2cv.Fuji	1107	98
1 ClonF5	1107	4 MdSDH3cv.Fuji	1107	92

Estos resultados fueron confirmados posteriormente a través de la secuenciación del ADN plasmidial de los 6 clones restantes. En todos los casos, los clones obtenidos mostraron mayor identidad con *MdSDH2* de manzanas cv. Mutsu (datos no mostrados). De las 9 isoformas descritas para *MdSDH*, la isoforma 3 de Fuji es la que se encuentra mejor caracterizada bioquímicamente (Park y cols, 2002). Por esta razón, se mantuvieron los esfuerzos para clonar esta isoforma frente a las otras.

4.1.2. Segundo intento de clonación de *MdSDH3*

Los resultados obtenidos del primer intento de clonación dejaron en duda dos de los pasos críticos en la amplificación de *MdSDH3*: **1)** la variedad adquirida de frutos de manzana para realizar las extracciones de ARN (Mutsu v/s Fuji) y **2)** la especificidad de los partidores utilizados para amplificar el ADNc de *MdSDH3*. Los partidores diseñados hibridan con los primeros y últimos 20 nucleótidos de la región codificante de *MdSDH3*, sin embargo, *MdSDH2*

difiere sólo en un nucleótido en esta zona, por lo que ambas isoformas pueden ser amplificadas. Por lo tanto, como segundo intento para clonar *MdSDH3* en un vector bacteriano, se consiguieron hojas jóvenes de manzano cv. Fuji de origen certificado (sección 3.2.1) y se diseñó un partidador en antisentido aún más específico a partir de la región 3' no traducible de *MdSDH3* (sección 3.6.2) en donde ambas isoformas comparten una menor identidad (75%).

De hojas de manzano cv. Fuji se extrajo ARN total de buena calidad, verificado mediante geles de agarosa (Figura 8A) y espectrofotometría (sección 3.6.1.2). Para obtener exclusivamente el ADNc correspondiente a *MdSDH3*, se realizaron reacciones de RT a la muestra de ARN tratada previamente con DNAsas utilizando el nuevo partidador antisentido diseñado en la región 3'UTR (*MdSDH3*'UTR, Tabla II). A partir del ADNc generado, se amplificó mediante PCR la secuencia de *MdSDH3* utilizando dos mezclas de partidores por separado. La mezcla 1 estaba compuesta por el partidador sentido *MdSDH*-Spe5' y el nuevo partidador antisentido (*MdSDH3*'UTR), con la cual se esperaba amplificar un fragmento de 1400 pb. La mezcla 2 estaba compuesta por los partidores *MdSDH*-Spe5' y *MdSDH*-Nhe3' usados anteriormente (sección 4.1.1; 1135 pb). Se realizaron varios intentos de amplificación utilizando la mezcla 1 de partidores, sin éxito, no obstante con la mezcla 2 sí fue posible obtener la banda del tamaño esperado (Figura 8B).

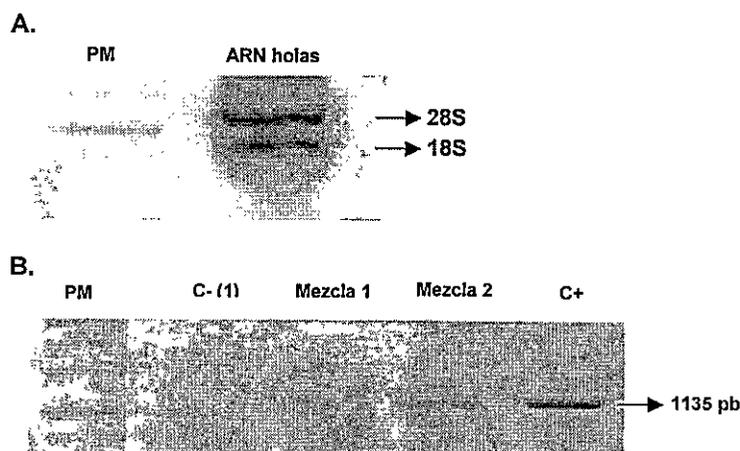


Figura 8. Muestra de ARN de hojas y amplificación de *MdSDH3* a partir de ADNc. **A:** Control de calidad del ARN extraído a partir de hojas jóvenes de manzana, se observan las bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S. **B:** Amplificación por PCR del ADNc generado de manera específica, utilizando dos mezclas de partidores: mezcla 1 (*MdSDH*-Spe5' y *MdSDH3*'UTR) y mezcla 2 (*MdSDH*-Spe5' y *MdSDH*-Nhe3'). Se observa la banda de 1135 pb correspondiente al tamaño esperado para *MdSDH* utilizando la mezcla 2 de partidores. Como control positivo de reacción se usó el clon F5 (C+) y como control negativo, una muestra de ARN previamente tratada con DNAsas (C-). PM: estándar peso molecular.

Se procedió a purificar y clonar en pCR8 la banda de 1135 pb (mezcla 2) amplificada a partir del ADNc generado de manera específica para *MdSDH3*. Diez colonias crecidas en medio de selección fueron evaluadas por PCR de colonia, resultando 8 clones positivos para la amplificación de *MdSDH3* (datos no mostrados). Estos resultados fueron verificados por digestiones enzimáticas usando la enzima *BstEII*; 4 de los 8 clones seleccionados presentaron la secuencia de *MdSDH3* en sentido (Figura 9).

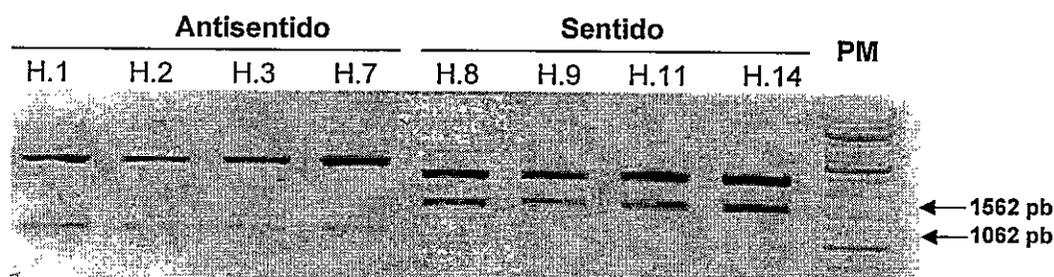


Figura 9. Digestión con *BstEII* del ADN plasmidial de clones positivos evaluados previamente por PCR de colonia. En gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se observan las bandas de 1562 pb y 1062 pb esperadas para el patrón de digestión con *BstEII* (ver figura 6A). De los 8 clones seleccionados la mitad presentan *MdSDH3* ligado en sentido en el vector de clonación. PM: estándar de peso molecular.

El ADN plasmidial de los 8 clones portadores de la construcción pCR8-MdSDH3 fueron secuenciados con los partidores universales M13F y M13R. Sólo dos de los 8 clones evaluados fueron descartados por presentar una mala secuenciación. El alineamiento de las secuencias restantes con la base de datos indicó nuevamente un mayor porcentaje de identidad nucleotídica con la isoforma 2 de *SDH* descrita en manzanos cv. Mutsu (datos no mostrados).

4.1.3. Análisis de las secuencias obtenidas

Secuencias obtenidas durante el primer y segundo intento de clonación de *MdSDH3*, fueron analizadas a partir de alineamientos realizados mediante ClustalW. De un total de 10 clones secuenciados, 8 compartieron un 100% de identidad a nivel aminoacídico entre sí, mientras que las 2 restantes se diferenciaron por el cambio en un aminoácido (99%). Debido que este cambio fue diferente para cada una de las dos secuencias, es probable que se deba a mutaciones puntuales introducidas durante la amplificación por PCR del ADNc.

Varias son las diferencias registradas a nivel nucleotídico entre las secuencias. Una diferencia importante de mencionar, es el cambio producido en el nucleótido 952. En este sitio se reemplaza la base adenina presente en *MdSDH3* por citosina. Este cambio puntual, no alteró el aminoácido codificado, sin embargo generó un sitio de corte para *PmlI* en la mayoría de las secuencias clonadas, salvo en el clon F8.

En Figura 10 se muestra un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas descritas (*MdSDH2cv.Fuji*, *MdSDH3cv.Fuji*, *MdSDH2cv.Mutsu*) y dos de las secuencias clonadas (F8 y H8). Se resaltan aquellos aminoácidos reconocidos en el sitio activo de catálisis para la familia de enzimas SDHs y los aminoácidos que conforman el sitio de unión a Zinc (Ohta y cols, 2005). Al comparar las secuencias clonadas con la correspondiente a *MdSDH3*, sólo se observa una sustitución conservativa (80Q/E) entre los aminoácidos catalíticamente importantes.

4.2. Construcción de vectores de sobre-expresión de *MdSDH* en plantas

Las siguientes etapas de clonación prosiguieron a partir de las secuencias clonadas correspondientes a *MdSDH2* en el vector pCR8 (clones H8 y F8) con el fin de construir vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica para *MdSDH* en plantas.

Para lograr este objetivo, se utilizaron los vectores de expresión derivados de pCambia1302: 35S-GFP y PG-GFP, construidos previamente (Mandujano, 2008).

La estrategia general de clonación desarrollada consistió en reemplazar la secuencia codificante para *GFP* en los vectores de expresión por el ADNc de *MdSDH2*. Para esto, se utilizaron enzimas que permitieran cortar tanto el *GFP* de los vectores de expresión como el ADNc de *MdSDH2* generando extremos compatibles que pudiesen ser empalmados posteriormente mediante ligación, obteniendo las construcciones de sobre-expresión: 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Con este fin, durante el presente trabajo de Seminario de Título se desarrollaron dos estrategias de clonación, las cuales se detallan a continuación y en Figura 11.

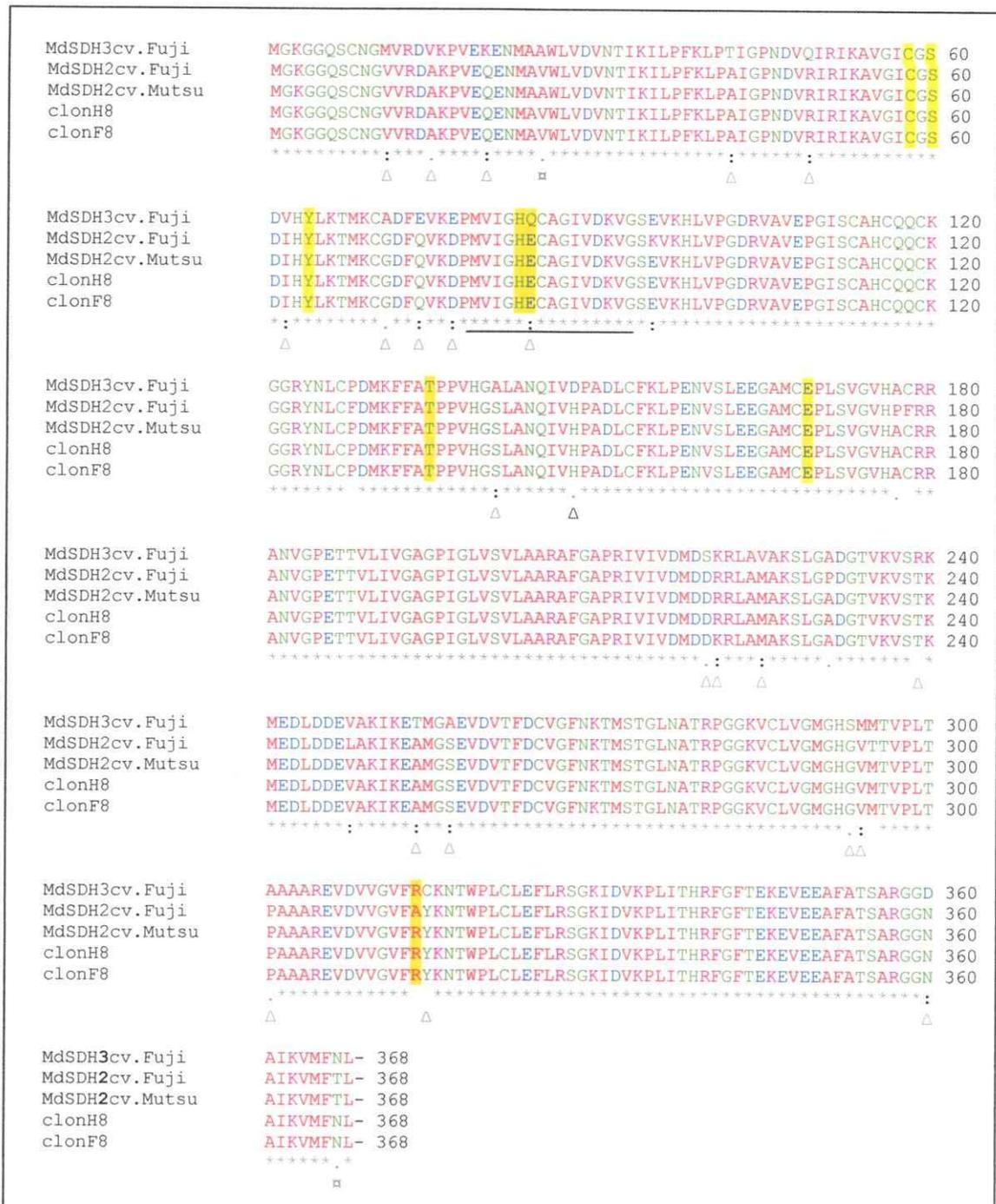


Figura 10. Alineamiento entre las secuencias aminoácidas de *MdSDH3* cv Fuji, *MdSDH2* cv Fuji, *MdSDH2* cv. Mutsu y dos de las secuencias clonadas (F8 y H8) mediante el programa ClustalW2. En amarillo se destacan los aminoácidos presentes en el sitio activo y demarcado con una línea se indica el sitio de unión a zinc altamente conservado en enzimas sorbitol deshidrogenasas. Las diferencias a nivel aminoacídico entre la isoforma 3 (*MdSDH3*cv.Fuji) y la isoforma 2 de la variedad Mutsu (*MdSDH2*cv.Mutsu) se resaltan por medio de triángulos (Δ) bajo la secuencia. Las dos diferencias observadas entre *MdSDH2*cv.Mutsu y las secuencias clonadas (H8 y F8) se distinguen por el símbolo (\square) bajo el alineamiento. Tanto la identidad como las sustituciones conservativas y semiconservativas entre aminoácidos se indican con los símbolos (+),(;),(.) respectivamente.

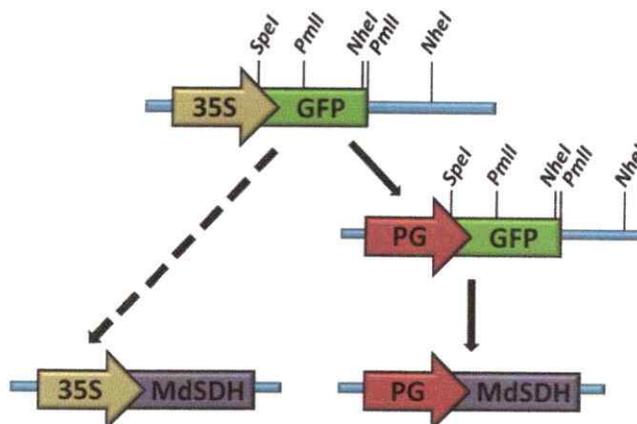


Figura 11. Esquema de la estrategia general desarrollada para la clonación de *MdSDH2* en los vectores binarios derivados de pCambia. Sobre cada vector se indica el sitio de corte de las enzimas utilizadas durante la primera estrategia (*SpeI* y *NheI*) y la segunda estrategia de clonación (*SpeI* y *PmlI*). Mediante el corte con estas enzimas se espera reemplazar la secuencia codificante para *GFP* por la de *MdSDH2* en los vectores binarios, 35S-GFP y PG-GFP, generando los vectores de expresión 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2

4.2.1 Primera estrategia de clonar *MdSDH2* en vectores de sobre-expresión.

Según la información disponible en el sitio pCambia (www.cambia.org), el vector 35S-GFP y su derivado PG-GFP contienen sitios de corte para *SpeI* y *NheI*, al inicio y al final respectivamente de la secuencia codificante para *GFP*. Debido a que *MdSDH2* no presenta sitios de corte internos para las enzimas mencionadas, se amplificó el ADNc de *MdSDH2* utilizando partidores específicos que agregaron sitios de corte para estas enzimas en los extremos 5' y 3', respectivamente y el producto fue clonado en pCR8 (secciones 4.1.1 y 4.1.2).

Con la digestión por separado de pCR8-MdSDH2 (clon H8; sección 4.1.2), 35S-GFP y PG-GFP con *SpeI* y *NheI*, se esperaba observar la liberación de una banda de ~ 1,1 kb correspondiente a *MdSDH2* a partir del vector pCR8-MdSDH2 y dos bandas de ~ 9,8 kb y ~ 750 pb (*GFP*) para cada vector de expresión. En el caso de pCR8-MdSDH2 se purificó desde geles el fragmento de ~ 1,1 kb (datos no mostrados). Sin embargo, en la digestión de los vectores de expresión, se obtuvo una banda inesperada, que corresponde a un sitio extra de corte para la enzima *NheI*, en el vector (Figura 12, nucleótido 4169).

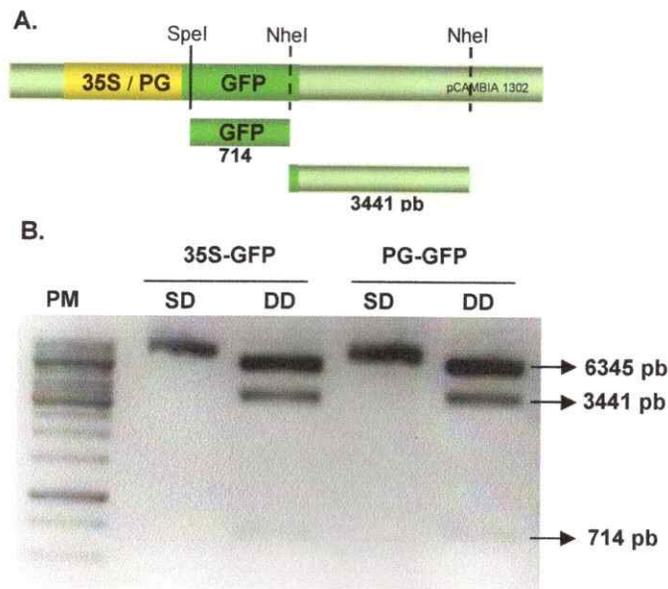


Figura 12. Digestión doble de los vectores de sobre-expresión 35S-GFP y PG-GFP con las enzimas *SpeI* y *NheI*. A: Esquema de la digestión. B: En gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se observan las bandas de 714pb, 3441 pb y 6345 pb correspondientes a 1 sitio de corte para *SpeI* y dos sitios para la enzima *NheI*. SD: ADN plasmidial sin digerir, DD: digestión doble con las enzimas mencionadas. PM: estándar de peso molecular.

Como posible solución al sitio extra de corte para *NheI*, se realizaron digestiones parciales de los vectores de expresión, con el objetivo de observar en geles de agarosa la banda de 9,8 kb correspondiente a un sólo corte. Con este fin se linearizaron 35S-GFP y PG-GFP con *SpeI* y luego se digirió el producto de la reacción durante un corto tiempo con *NheI* (sección 3.6.5.2). Mediante este procedimiento, fue posible observar en geles de agarosa de 0,5% la banda de 9,8 kb correspondiente a la liberación de *GFP* de los vectores de expresión (Figura 13). Se purificó esta banda y se repitió este procedimiento hasta acumular una cantidad de producto purificado suficiente para los ensayos posteriores de ligación.

Los fragmentos purificados de 1,1 kb (*MdSDH2*) y 9,8 kb fueron ligados con ADN T4 ligasa (sección 3.7.2.2). Con el producto de la ligación, se transformaron células de *E. coli* competentes. Los clones crecidos en medio de selección (kanamicina) fueron evaluados por PCR de colonia amplificando paralelamente la secuencia de *GFP* y *MdSDH2* para cada clon (Tabla I y II, Figura 13) con el fin de verificar el éxito de la digestión parcial y la ligación.



Figura 13. Digestión parcial de los vectores de sobre-expresión 35S-GFP y PG-GFP con las enzimas *SpeI* y *NheI*. En gel de agarosa 0,5% teñido con bromuro de etidio se observan los productos de la digestión con *NheI* durante 10 y 15 min luego de ser linearizado el ADN plasmidial de los vectores con *SpeI*. Con flechas se indican las bandas de 10,5 kb correspondiente al vector sin digerir linearizado con *SpeI* y la banda de 9,8kb (un corte de la enzima *NheI*) SD: ADN plasmidial sin digerir, DD: digestión doble con las enzimas mencionadas. PM: estándar de peso molecular.

Como se muestra en Figura 14, fueron observados tres fenómenos debido a los sitios compatibles generados por la enzimas utilizadas: Caso 1) amplificado correspondiente a *MdSDH2* (1135 pb) y ausencia de banda correspondiente a *GFP* (500 pb). Caso 2) amplificación tanto de *MdSDH2* y *GFP*, y Caso 3) amplificación sólo de *GFP* originada por una auto-ligación del vector.

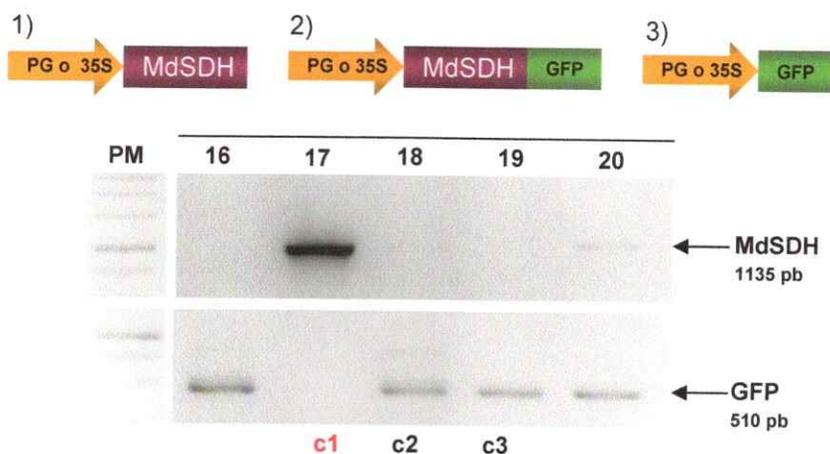


Figura 14. PCR de colonia para evaluar clones portadores de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. La reacción de PCR tuvo como fin amplificar el ADNc de *MdSDH2* (1135 pb) y de *GFP* (500 pb) de forma paralela. **A:** esquema de los 3 casos posibles, caso 1) amplificación sólo de *MdSDH2*, 2) amplificación tanto de *MdSDH2* como de *GFP*, 3) amplificación sólo de *GFP*. **B:** Gel de agarosa muestra 5 de los 20 clones evaluados para la construcción PG-MdSDH2, en donde se observa al menos un clon en cada caso descrito (c1, c2 y c3). PM: estándar de peso molecular.

Sólo 3 de 20 clones evaluados para la construcción PG-MdSDH2 presentaron el resultado deseado (caso 1). Análisis posteriores mediante PCR utilizando ADN plasmidial y los partidores PG-BamHI-F y MdSDH-Nhe3', indicaron que sólo uno de ellos poseía el inserto en sentido en este vector (clon 17, Figura 15). Posteriores análisis de restricción utilizando *BstEII* y *PmlI* (Figura 16) indicaron que este clon correspondía a la construcción PG-MdSDH-MdSDH, en la cual dos fragmentos de *MdSDH2* habían sido ligados en tándem. Es importante mencionar, que la secuencia de *MdSDH* clonada en este vector se obtuvo a partir del clon H8 (pCR8-MdSDH2) el cual presenta un sitio de corte interno fortuito para *PmlI* (sección 4.1.3) permitiendo este análisis.

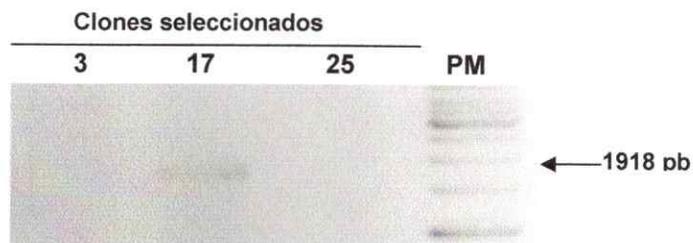


Figura 15. PCR para evaluar la orientación del inserto en construcciones PG-MdSDH2. ADN plasmidial de 3 clones previamente seleccionados fue usado como molde en reacciones de PCR utilizando los partidores PG-BamHI-F y MdSDH-Nhe3'. Se esperó un amplificado de 1918 pb, presente sólo en clon 17. **PM:** estándar de peso molecular.

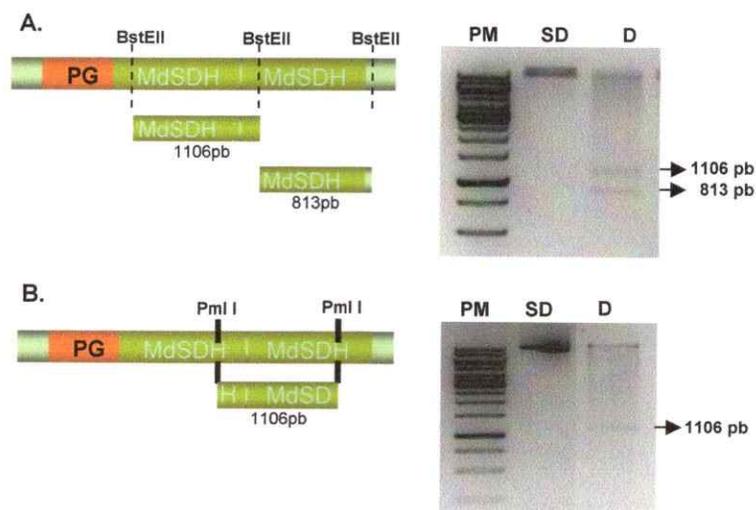


Figura 16. Ensayos de restricción para clon 17. Digestiones por separado con las enzimas *BstEII* y *PmlI* indicaron que clon 17 presentaba la secuencia de *MdSDH2* ligada en tándem bajo el promotor PG (PG-MdSDH-MdSDH). **A:** Digestión con la enzima *BstEII*. **B:** Digestión con *PmlI*. Para ambas digestiones, se muestra un esquema con los tamaños esperados de digestión a la izquierda de la figura y su verificación en geles de agarosa a la derecha. **SD:** ADN plasmidial sin digerir. **D:** Digestión con la enzima correspondiente. **PM:** estándar de peso molecular.

Con respecto a las posibles construcciones 35S-MdSDH2, dos clones de 20 evaluados resultaron positivos (caso 1) para el PCR de colonia realizado. Utilizando ADN plasmidial y los partidores 35S F y MdSDH-Nhe3' se realizó un PCR con el objetivo de amplificar el fragmento promotor-gen en el vector de expresión constitutivo. No se obtuvo el amplificado esperado de 1617 pb, por lo que ninguno de los insertos se encontraba en sentido en el vector. Por digestiones enzimáticas con la enzima *BstEII* se comprobó que en ambos clones la secuencia de *MdSDH2* se había ligado en antisentido y que además poseían *GFP* (datos no mostrados). Ya que no se obtuvo un clon con la construcción 35S-MdSDH2, el clon 17 de PG-MdSDH2 portador del vector en tándem fue descartado al no poseer su control positivo.

4.2.2. Segunda estrategia de clonación *MdSDH2* en vectores de sobre-expresión

Como se describió en sección 4.1.3, salvo un clon (F8), la mayoría de las secuencias correspondientes a *MdSDH2* clonadas en pCR8 presentaron un sitio de corte para la enzima *PmlI* dentro de la secuencia codificante. Sin embargo, la obtención del clon F8, permitió realizar una segunda estrategia de clonación utilizando las enzimas *SpeI* y *PmlI* cuyos sitios flanquean *GFP* en los vectores 35S-GFP y PG-GFP con el objetivo de ligar *MdSDH2* en estos vectores de sobre-expresión.

Con este fin, se diseñó un partidador antisentido que agregó a la secuencia de *MdSDH2* un sitio para *PmlI* en su extremo 3', luego del codón de término (Tabla II). Mediante PCR fue amplificado *MdSDH2* a partir del clon F8, utilizando los partidores MdSDH-Spe5' y MdSDH-PmlI3'. La banda obtenida en geles de agarosa (1135 pb) fue purificada y clonada en pCR8. Luego, se realizó un PCR de colonia a los clones que crecieron en medio de selección. Los clones positivos fueron secuenciados, obteniendo un 100% de identidad respecto al clon F8. Se les extrajo el ADN plasmidial y se realizó una digestión doble con las enzimas *SpeI* y *PmlI* liberando la banda esperada, correspondiente a *MdSDH2* (Figura 17 A). Paralelamente, los vectores 35S-GFP y PG-GFP fueron digeridos con ambas enzimas, observando el patrón de digestión esperado (Figura 17 B). A diferencia de las enzimas utilizadas en la estrategia 1 (*SpeI*

y *NheI*), *SpeI* y *PmlI* no generan extremos compatibles, descartando la posibilidad de auto-ligación de los vectores de expresión y asegurando la inserción en sentido de *MdSDH2*.

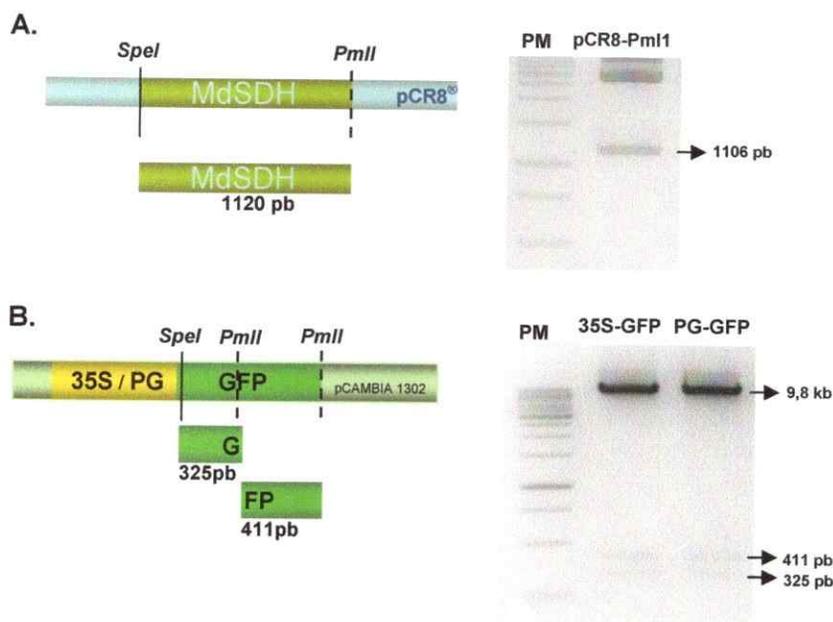


Figura 17. Doble digestión con las enzimas *SpeI* y *PmlI* de los vectores pCR8-Pml1, 35S-GFP y PG-GFP. **A:** Doble digestión del ADN plasmidial del vector de clonación pCR8-Pml1. **B:** Doble digestión de los vectores de expresión 35S-GFP y PG-GFP. Para ambos casos, se muestra un esquema con los tamaños esperados de digestión a la izquierda de la figura y su verificación en geles de agarosa a la derecha. **PM:** estándar de peso molecular.

Tanto la banda de ~1100 pb (*MdSDH2*) como la de 9,8 kb (vectores de expresión "sin *GFP*") fueron purificadas desde geles, para luego ser ligadas mediante ADN T4 ligasa. Con el producto obtenido, se transformaron células de *E. coli* competentes y se seleccionaron colonias positivas en medio suplementado con kanamicina. A clones positivos, evaluados por PCR de colonia, se les realizó extracciones de ADN plasmidial para verificar la presencia y orientación del inserto. Se amplificaron los fragmentos promotor-gen para cada construcción, obteniéndose el tamaño de banda esperado en cada caso (1918 pb para PG-*MdSDH2* y 1602 pb para 35S-*MdSDH2*; controles positivos Figura 19). Además se verificó con éxito la ausencia de *GFP* y direccionalidad de estos clones mediante ensayo de restricción con *BstEII* (Figura 18).

De esta manera, finalmente fue posible generar las construcciones de sobre-expresión constitutiva (35-*MdSDH2*) y fruto-específica (PG-*MdSDH2*) para *SDH* en plantas.

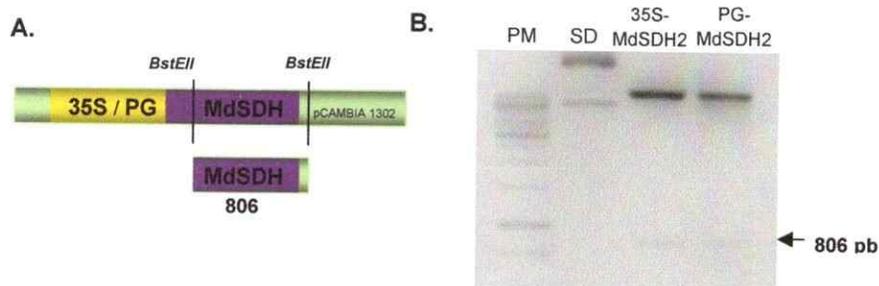


Figura 18. Ensayo de restricción con *BstEII* de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Mediante la digestión con *BstEII* es posible confirmar tanto la orientación del inserto como la ausencia de *GFP* en las construcciones generadas. **A:** esquema de la digestión. **B:** en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se observa la banda de ~800 pb correspondiente a la orientación en sentido de *MdSDH2* bajo el control de los promotores PG y 35S en las construcciones generadas. **SD:** ADN plasmidial sin digerir (correspondiente a la construcción 35S-MdSDH2). **PM:** estándar de peso molecular.

4.2.3. Transformación de *A. tumefaciens* con los vectores de sobre-expresión

Se transformó *A. tumefaciens* con ADN plasmidial de los vectores 35S-GFP, PG-GFP (Mandujano, 2008), 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2 (este trabajo) como se describe en sección 3.3.5. Para cada caso, a 2 clones crecidos en el medio de selección, se les extrajo su ADN plasmidial y se realizaron reacciones de PCR para confirmar la presencia del vector.

Para clones de *A. tumefaciens* transformados con los vectores 35S-GFP y PG-GFP, se amplificaron 500 pb de la secuencia de *GFP* utilizando los partidores GFP 5' y GFP 3' (datos no mostrados; Tabla II). Para verificar los clones transformados con los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2, se amplificó el fragmento promotor-gen utilizando los partidores y condiciones de reacción ya estandarizadas (sección 3.6.4.1). Mediante electroforesis se observó el amplificado esperado para todos los clones analizados (Figura 19). El clon 1 de cada vector fue seleccionado para continuar con el análisis funcional de las construcciones realizadas.

4.3. Análisis de funcionalidad de los vectores de expresión construidos.

Para evaluar la funcionalidad de los vectores de expresión 35S-GFP, PG-GFP y los vectores construidos en este Seminario de Título (35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2) se transformaron transitoriamente hojas de tabaco y frutos de tomate con *A. tumefaciens* portadora de los vectores mencionados, mediante agro-infiltración y agro-inyección, respectivamente (sección 3.8.2).

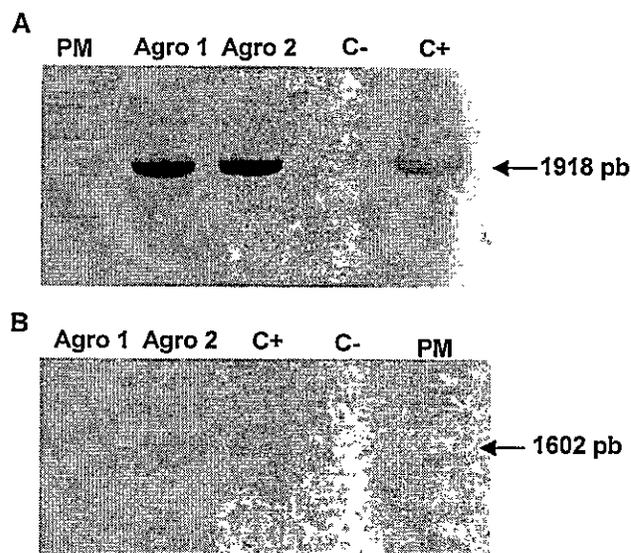


Figura 19. PCR a partir de ADN plasmidial de *A. tumefaciens* para evaluar clones portadores de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. A: amplificación del fragmento PG-MdSDH2 utilizando partidores específicos: Se observa el fragmento de ~1,9 kb en los dos clones evaluados. B: amplificación del fragmento 35S-MdSDH2 ambos clones analizados presentan la banda de ~1,6 pb esperada. En A y B se usó como control positivo (C+) una muestra del correspondiente ADN plasmidial purificada desde *E. coli*, 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2 respectivamente (sección 4.2.2) y como control negativo (C-) agua NP. PM: estándar de peso molecular.

4.3.1 Análisis mediante microscopía de epifluorescencia

Para corroborar la expresión fruto-específica del promotor PG, luego de 4 días efectuada la transformación de hojas y frutos, se realizaron cortes delgados del tejido y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia con el fin de detectar *GFP*.

En hojas de tabaco infiltrados con el vector 35S-GFP, se observó alta fluorescencia en regiones confinadas de células. La proteína GFP debido a su pequeño tamaño (251 aa) es destinada principalmente al citoplasma y núcleo celular, lo cual fue observado en muestras transformadas con este vector (Figura 20A, n y c). Como era esperado al evaluar su expresión en hojas, muestras transformadas con el vector fruto-específico PG-GFP no presentaron fluorescencia (Figura 20B). Se obtuvieron resultados similares con los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2, utilizados como controles negativos al ser liberada la secuencia de *GFP* en ambas construcciones. En estas muestras sólo se distinguió la auto-fluorescencia endógena de estomas y cloroplastos al igual que en Figura 20 B.

En muestras de pericarpio de frutos de tomate agro-inyectados con los vectores 35S-GFP y PG-GFP, se observó fluorescencia en grupos celulares aislados, como era esperado para ambas construcciones (Figura 20C y D). No se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia observada entre estas muestras. En tejido agroinyectado con los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2 sólo se observó la auto-fluorescencia endógena de la muestra (datos no mostrados).

En conjunto, la observación de fluorescencia en frutos y no en hojas al expresar el vector PG-GFP, confirma que este promotor guía la expresión de genes en frutos.

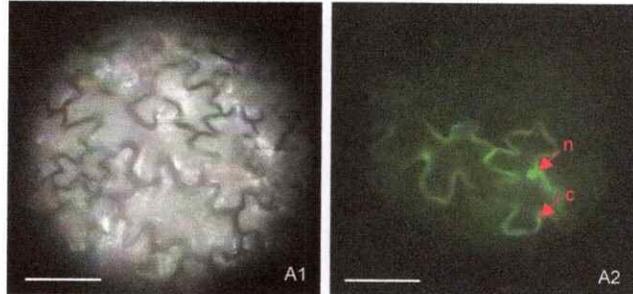
4.3.2. Análisis molecular de la expresión de *MdSDH2*.

Luego de comprobar la funcionalidad de los promotores, se determinó la expresión del ADNc de *MdSDH2* mediante RT-PCR. Para ello, se transformaron transitoriamente hojas de tabaco y frutos de durazno con *A. tumefaciens* portadora de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Como control negativo de expresión, se utilizó *A. tumefaciens* sin transformar (cepa GV3101). Se extrajo el ARN total de los tejidos agro-infiltrados y agro-inyectados, cuantificándolos y determinando su integridad por electroforesis (datos no mostrados). Luego de realizar la reacción de RT con el partidor Oligo-AP, se comprobó que la calidad del ADNc total generado era la adecuada usando la expresión del gen 18S (Figura 21 A). A continuación, se realizó la reacción de PCR utilizando partidores específicos para amplificar *MdSDH2*.

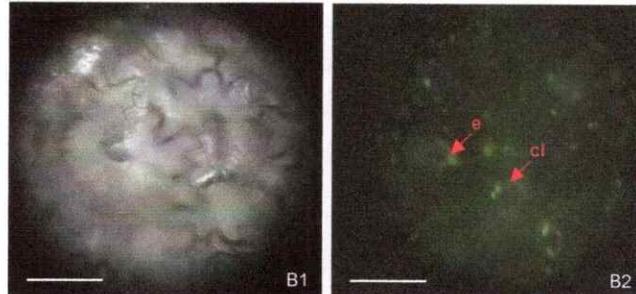
En muestras de tabaco, los resultados revelaron la expresión del ARN mensajero de *MdSDH2* sólo en tejido agro-infiltrado con el vector 35S-MdSDH2 (Figura 21 B1). En muestras de frutos de durazno se amplificó la banda esperada correspondiente al ADNc de *MdSDH2* en tejidos agro-inyectados con los vectores de expresión constitutiva y fruto-específica, como era esperado (Figura 21 B2).

Tabaco

A. 35S-GFP

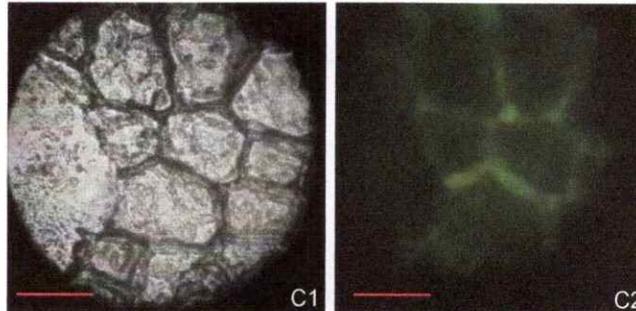


B. PG-GFP



Tomate

C. 35S-GFP



D. PG-GFP

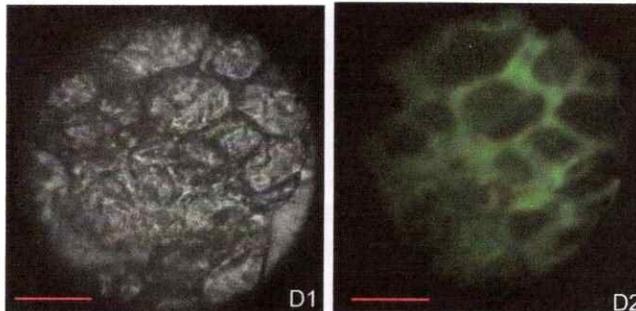


Figura 20: Comprobación de la funcionalidad de los vectores 35S-GFP y PG-GFP mediante transformación transitoria de tabaco y frutos de tomate. Fotos obtenidas luego de 4 días realizada la transformación **A:** tabaco transformado con el vector 35S-GFP. **B:** tabaco transformado con el vector PG-GFP. **C:** Muestra de pericarpio de tomate transformado con el vector 35S-GFP. **D:** Pericarpio de tomate transformado con el vector PG-GFP. A1,B1,C1,D1: imágenes obtenidas en campo claro; A2,B2,C2,D2: imágenes en campo oscuro con luz de emisión de 488 nm. Con flechas se indica: núcleo (n), citoplasma (c) estomas (e) y cloroplastos (cl). Las fotografías fueron obtenidas con una cámara fotográfica a un tiempo de exposición de 0,25 seg, utilizando microscopía de epifluorescencia (A y B: lente 63X. C y D: lente 20X). La barra blanca y roja equivalen a 0,1 y 0,3 μm , respectivamente.

No se detectó expresión en muestras de hojas y frutos transformadas con *A. tumefaciens* GV3101, confirmando la especificidad de los partidores utilizados, al no amplificar el *SDH* endógeno de durazno (Figura 21 B3). Como control negativo para la reacción de PCR se usó como molde el ARN tratado con DNAsas en forma directa; al no observar amplificado, se dedujo que no había contaminación de ADN genómico en las muestras de ARN evaluadas.

Con estos experimentos se logró comprobar la funcionalidad transcripcional de los vectores de expresión generados, PG-MdSDH2 y 35S-MdSDH2.

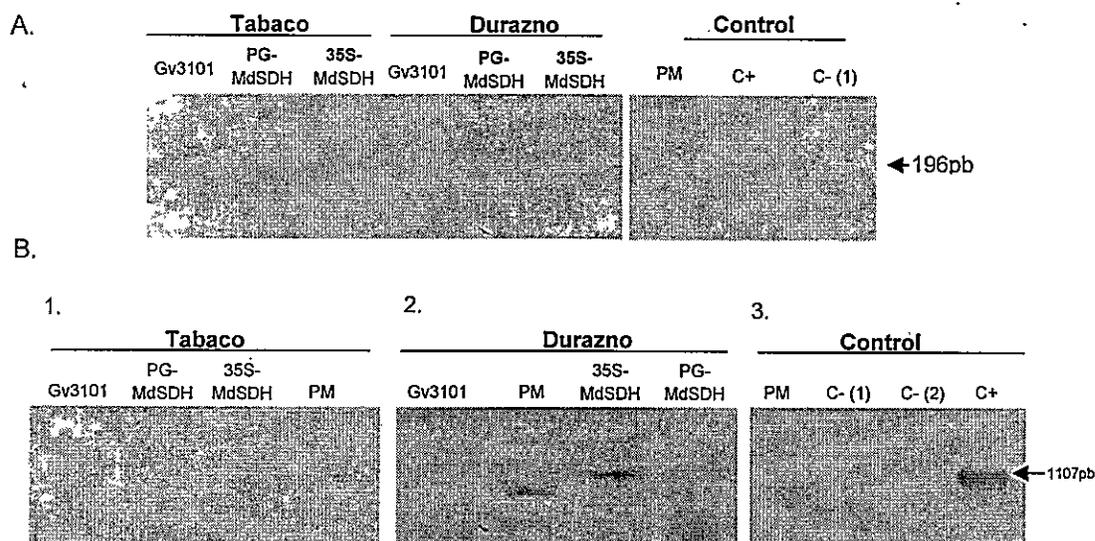


Figura 21. Amplificación de gen 18S y *MdSDH2* a partir de muestras de ADNc obtenido de hojas de tabaco y frutos de duraznos transformados transitoriamente con los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio muestran la amplificación de un fragmento de 196 pb del gen 18S como control de calidad de las muestras de ADNc obtenidas de tejidos transformados con *A. tumefaciens* portadora de los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2 y sin transformar (GV3101; A). A partir de estas muestras se amplificó el gen de *MdSDH2* (1135 pb; B). Como controles de la reacción de PCR se utilizó como molde: ARN tratado con DNAsas (C- 1), agua NP (C- 2), ADN genómico de tomate (C+1) y ADN plasmidial del clon pCR8-p1 (C+ 2). PM: estándar de peso molecular.

4.4. Implementación de un sistema de transformación estable de tomate

4.4.1. Generación de plantas transgénicas de tomate

Con *A. tumefaciens* portadora de los vectores 35S-LeSDH y PG-LeSDH (Mandujano, 2008) se transformaron establemente explantes de tomate y se sometieron al proceso de organogénesis somática (sección 3.9). La Figura 22 muestra los explantes en las diferentes etapas del proceso.

Para la transformación estable se utilizaron cotiledones de tomate crecidos en condiciones *in vitro*, 7 días transcurrida la germinación (Figura 22 A). Cotiledones de 5 cm de longitud fueron seleccionados y preparados según el método flamingo (Figura 22 B). El método flamingo implicó el corte de una de las hojas del cotiledón y el brote meristemático desarrollado entre ambas hojas (flecha). En Figura 22 C se presentan explantes tipo flamingo recién transformados con *A. tumefaciens* portadora de los vectores de sobre-expresión. Luego, 35 explantes transformados con cada vector fueron cultivados en medios suplementados con el antibiótico higromicina para la selección del transgén durante todo el proceso de organogénesis. En la Figura 22 D se aprecia el engrosamiento del diámetro de los explantes, lo que refleja la acción de *A. tumefaciens* y de las hormonas BAP e IBA suplementadas en el medio de cultivo. La formación de callo se observó a partir de la tercera semana de cultivo en este medio y el desarrollo de brotes transcurrida la quinta semana (Figura 22 E). Explantes que desarrollaron callos de color café oscuro (signo de muerte por higromicina) o de color blanco (incapacidad de regeneración) fueron descartados. En la Figura 22 F se observa la elongación de los brotes avanzada la cuarta semana de cultivo en medio sin fitohormonas. Se transfirieron estos explantes a frascos con medio suplementado con IBA para favorecer el enraizamiento (Figura 22 G) y luego fueron aclimatados en tierra durante 2 meses para finalmente mantener las plantas en el invernadero para su posterior desarrollo. Mediante este procedimiento se obtuvieron 7 plántulas transformantes para cada construcción con un desarrollo adecuado para ser traspasadas a tierra. Sin embargo, sólo 4 líneas transformadas con la construcción PG-LeSDH y 2 líneas 35S-LeSDH sobrevivieron a la etapa de aclimatación.

En Figura 23 se muestra el desarrollo transcurrida la quinta semana de los controles realizados de transformación (sección 3.9.4). Controles positivos presentaron un desarrollo similar al observado en explantes transformantes durante el proceso de organogénesis. En cambio, controles negativos de transformación fueron drásticamente afectados por higromicina a partir de la tercera semana de cultivo en medio de inducción.

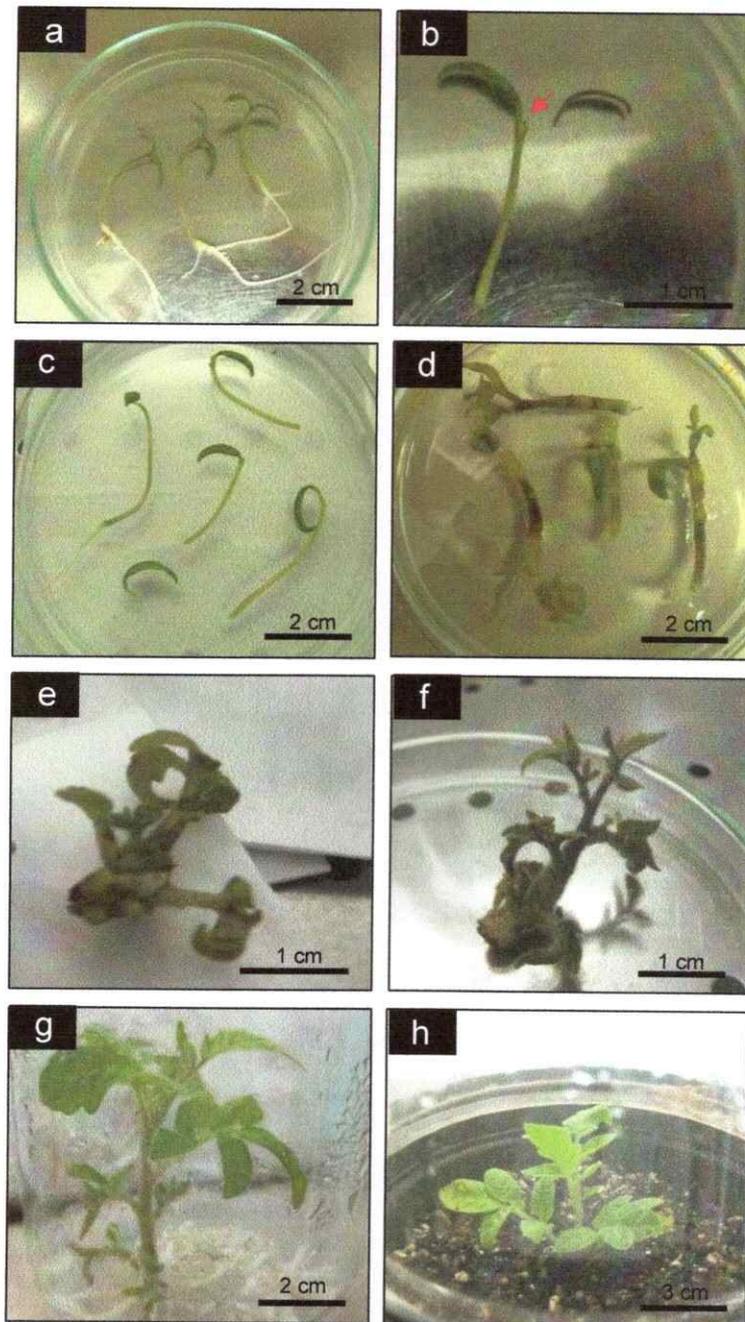


Figura 22. Organogénesis somática de explantes de tomate transformados con 35S-LeSDH y PG-LeSDH mediante *A. tumefaciens*. A: cotiledones de tomate de 7 días de crecimiento *in vitro* en medio A. B: Detalle del corte tipo flamingo realizado a cotiledones seleccionados de 7 días. Con la flecha se indica la remoción del brote meristemático. C: explantes recién transformados con *A. tumefaciens* en medio B líquido. D: explantes mantenidos en medio de inducción (C) durante 10 días. E: formación de callo y desarrollo de brotes en un explante de 6 semanas, en medio (C). F: Detalle de un explante luego de 4 semanas en medio de elongación (D). G: Explante de 15 semanas en condiciones de enraizamiento. H: planta de 5 meses traspasada a tierra, en etapa de aclimatación.

Como se observa en la figura 23, el desarrollo de callo no fue normal en estos explantes (C-), y murieron por necrosis en un plazo aproximado de 2 meses. Estos resultados verifican que la concentración de higromicina utilizada (2,5 mg/L) es adecuada para seleccionar explantes de tomate que incorporen establemente el transgén.



Figura 23. Controles de transformación mantenidos durante 4 semanas en medio de inducción. Explantes preparados según el método flamingo fueron transferidos a medio C sin higromicina para el caso de controles positivos (C+) o suplementado con higromicina para C- (sección 3.9.4).

4.4.2. Análisis molecular de las líneas generadas para confirmar la transgénesis en plantas de tomate transformadas establemente.

Para confirmar la inserción estable del ADN-T en las plantas transformadas con las construcciones 35S-LeSDH y PG-LeSDH, se extrajo ADN genómico a partir de hojas (sección 3.4.3). Este ADN se usó como molde para realizar un PCR con partidores específicos para el gen que confiere resistencia a higromicina (*hptII*) presente en el ADN-T (Figura 24 A, Tabla I y II). Se observó un amplificado del tamaño esperado en las 6 líneas transformantes. En Figura 24 B se presenta el análisis por PCR de una línea transgénica para cada construcción.

De este modo se concluye que mediante la implementación de un método de transformación estable de tomate es posible regenerar plantas transgénicas portadora de los vectores de sobre- expresión para *SDH*.

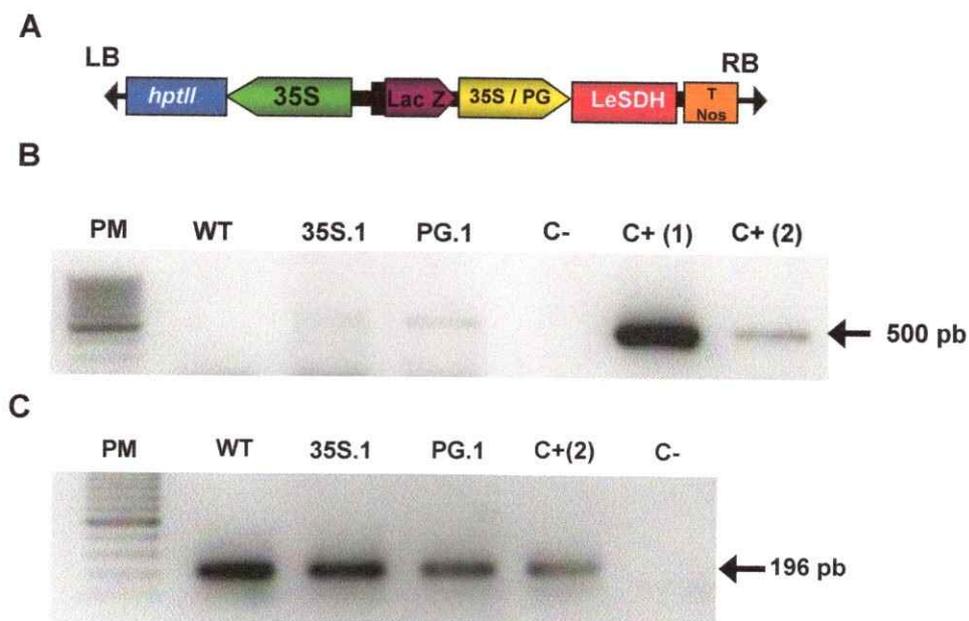


Figura 24. Amplificación del gen de resistencia a higromicina como evidencia de la transgénesis de plántulas de tomate obtenidas mediante organogénesis somática. A: esquema del ADN-T de los vectores de sobre-expresión utilizados para la transformación: 35S-LeSDH y PG-LeSDH. B: PCR del gen de resistencia a higromicina (*hptII*) a partir de ADN genómico extraído de una línea para cada construcción (35S.1 y PG.1), se observa la banda de 500 pb correspondiente al tamaño esperado. C: Evaluación de la calidad del ADN genómico extraído a través de la amplificación del gen 18S, se observa la banda de 196 pb. Como control negativo (C-) se utilizó el ADN de plantas de tomate silvestre (wt) (en B) y agua NP (en C) como molde. Como controles positivos se utilizó ADN plasmidial del vector 35S-LeSDH (C+1) y ADN genómico de plantas de tabaco transgénicas resistentes a higromicina (C+2, Gentileza Ampuero). PM: estándar de peso molecular.

5. DISCUSIÓN

La sobre-expresión fruto-específica de *SDH* en manzanos permitiría convertir el sorbitol remanente presente en los frutos al final de su desarrollo en fructosa, un azúcar con mayor poder edulcorante, aumentando de esta forma su dulzor. En el presente Seminario de Título se desarrollaron estrategias que permitieron la clonación de una isoforma de *SDH* descrita en manzanas en vectores de expresión que permitirán la sobre-expresión fruto-específica de este gen en plantas. Asimismo, se implementó la técnica de transformación estable de tomate con el fin de evaluar en un futuro próximo la expresión y actividad de *SDH* en frutos de tomates transgénicos, como un paso previo para la transformación estable de manzanos. Los puntos mencionados son críticos para verificar y constatar lo que se planteó como estrategia para generar una nueva variedad premium de manzanas con mayor dulzor.

Dos estrategias de clonación fueron desarrolladas para tratar de amplificar específicamente la isoforma 3 de *SDH* descrita en manzana cv Fuji (*MdSDH3*). En ambos intentos de clonación se utilizaron órganos de manzanos cv Fuji en donde se había registrado una alta expresión de la isoforma y partidores que hibridaban específicamente con la secuencia depositada para *MdSDH3* en la base de datos (AF323506). En ambas estrategias implementadas, de 10 clones evaluados 7 y 8 clones, respectivamente, presentaron ligada la secuencia amplificada de 1135 pb en el vector bacteriano pCR8. Estos resultados indicaron una alta eficiencia de clonación (>75%), lo cual permite corroborar que el sistema pCR8 es una metodología eficiente en la clonación de productos de PCR. La secuenciación y los análisis bioinformáticos de 4 y 6 clones, obtenidos en el primer y segundo intento de clonación respectivamente, indicaron que la mayor identidad a nivel nucleotídico se alcanzaba con la isoforma 2 de *SDH* descrita en manzanas cv Mutsu (99% de identidad; Nosarszewski y cols, 2004). Estos resultados fueron inesperados, tanto por la isoforma clonada como por la variedad de manzana en la que había sido descrita. Las razones que podrían explicar cada uno de estos aspectos serán discutidos de manera independiente.

Clonación de MdSDH2 en vez de MdSDH3. Ambas isoformas de SDH presentan una alta identidad a nivel nucleotídico (91%), identidad que es aún más alta en los primeros y últimos 20 nucleótidos de la región codificante de las secuencias, en donde sólo se presenta un nucleótido de diferencia entre ambas isoformas. En el primer intento de clonación, se utilizaron partidores que hibridaban específicamente con estas regiones, por lo cual la probabilidad de amplificar *MdSDH2* y *MdSDH3* era aproximadamente la misma. Con el fin de evitar esto, un partidor aún más específico fue diseñado a partir de la región 3' no traducible de *MdSDH3*, en esta región ambas isoformas comparten un 75% de identidad. En un segundo intento de clonación, se generó ADNc utilizando este partidor con el objetivo de conferir alta especificidad para *MdSDH3* en la reacción de RT-PCR. Ya que los resultados obtenidos luego de la secuenciación de los clones positivos fueron los mismos, es probable que debido a la baja temperatura de apareamiento (42 °C) en que ha sido estandarizado el programa de RT-PCR, el partidor lograra hibridar tanto con el ADNc correspondiente a la isoforma 3 como a la 2. A partir de los resultados obtenidos es posible conjeturar que la expresión de *MdSDH2* en los tejidos utilizados (frutos y hojas jóvenes) es mayor que la expresión de *MdSDH3*. La diferencia de expresión entre ambas isoformas explicaría los resultados obtenidos en el presente Seminario de Título, sin embargo contradice el patrón de expresión registrado por Park y cols (2002, Figura 3). En su trabajo, se utiliza una sonda específica y diferente para hibridar y registrar la expresión de cada isoforma en los distintos órganos evaluados, generando la posibilidad de que la afinidad de la sonda sea distinta y por lo tanto los niveles de expresión observados sean alterados. En este contexto, una mayor expresión de *MdSDH2* en frutos y hojas jóvenes de manzano cv Fuji puede ser considerada.

Clonación de una isoforma descrita en una variedad diferente a la Fuji. El análisis de las secuencias obtenidas indicó que compartían un 99% de identidad con la isoforma 2 descrita en la variedad Mutsu y un 98% con la misma isoforma descrita en manzanas cv Fuji. Generalmente pequeñas diferencias a nivel nucleotídico son asociados a posibles errores introducidos durante la amplificación. Esta posibilidad fue descartada debido a dos razones: la alta fidelidad de la

ADN polimerasa utilizada para la amplificación (*Pfu polimerasa* presenta una tasa de error de $1,6 \times 10^{-6}$ por base incorporada; Picard y cols, 1994) y que los cambios observados fueron altamente conservados en las secuencias obtenidas en la primera y segunda estrategia de clonación. Debido a que se utilizó frutos y hojas jóvenes de manzanos variedad Fuji (de origen certero) es posible inferir que las diferencias observadas podrían deberse a variaciones genotípicas dentro de la variedad Fuji, siendo esta la única explicación lógica.

La mayoría de las secuencias clonadas compartieron un 100% de identidad a nivel aminoacídico, siendo conservados los aminoácidos correspondientes al sitio activo de catálisis para la familia de enzimas SDHs y los aminoácidos que conforman el sitio de unión a Zinc (Figura 8). En aquellos aminoácidos correspondientes al sitio catalítico, existen dos diferencias entre las secuencias aminoacídicas de *MdSDH2* y *MdSDH3*. Estos dos cambios podrían ser responsables de la diferencia catalítica registrada para la oxidación de sorbitol de cada isoforma. La actividad enzimática de *MdSDH2* es menor a la registrada para *MdSDH3* (0,34 frente a 0,7 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína; Park y cols, 2002). Sin embargo, el cociente de velocidades en la oxidación de sorbitol con respecto a la reacción reversa es mayor (4,5 veces frente a 2,9 veces). Considerando el objetivo principal del proyecto Innova-CORFO, una menor actividad puede ser favorable en la sobre-expresión fruto-específica de *MdSDH* en manzanos, ya que de esta forma no se afectaría drásticamente el metabolismo de sorbitol en sus frutos, aumentando su dulzor de manera moderada. Por estas razones, y debido a los intentos de clonación realizados, se prosigió la estrategia de sobre-expresión utilizando una de las secuencias clonadas correspondiente a la isoforma 2.

A partir de los vectores de expresión derivados de pCambia: 35S-GFP y PG-GFP fue posible construir vectores de sobre-expresión constitutiva y fruto-específica para *MdSDH2* en plantas, llamados respectivamente 35S-*MdSDH2* y PG-*MdSDH2*. La clonación de *MdSDH2* en los vectores de expresión no estuvo exenta de dificultades, siendo necesario desarrollar dos estrategias para lograr las construcciones esperadas. La primera estrategia desarrollada

consideró una digestión parcial de los vectores de expresión, debido a la presencia de un sitio extra e inesperado de corte para la endonucleasa *NheI* en su secuencia. Análisis de 50 clones transformantes de 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2 indicaron que sólo en un caso la digestión parcial realizada había sido efectiva (PG-MdSDH2 en tandem, clon 17). La baja eficiencia observada (0,02%) puede ser atribuida tanto a la dificultad para separar y purificar fragmentos de pesos moleculares altos y similares mediante geles de agarosa (10,5 kb vs 9,8 kb), como al hecho que los extremos generados por las enzimas utilizadas (*NheI* y *SpeI*) sean cohesivos entre sí. La dificultad para separar banda de alto peso molecular puede haber conllevado a que el fragmento de gel escindido para su purificación (banda de 9,8 kb) pudiese haber contenido parte de la banda no deseada correspondiente a la linearización del vector (10,5 kb), ambos fragmentos de ADN purificados al estar en presencia de ligasa pueden haber sido autoligados debido a sus extremos cohesivos disminuyendo la probabilidad de ser unidos al fragmento correspondiente a *MdSDH2* y explicando la baja eficiencia obtenida. La autoligación puede ser evitada mediante la previa desfosforilación de los vectores, sin embargo utilizando este procedimiento no se obtuvieron clones positivos (datos no mostrados).

La segunda estrategia de clonación consideró el corte de los vectores con *SpeI* y *PmlI*. A diferencia de lo ocurrido en la primera estrategia, estas enzimas no generan sitios compatibles permitiendo la ligación en sentido del inserto (*MdSDH2*) e impidiendo la autoligación del vector de expresión. Mediante esta estrategia, la clonación de *MdSDH2* en los vectores de expresión fue realizada con relativa facilidad, obteniéndose los vectores 35S-MdSDH2 y PG-MdSDH2.

La funcionalidad de los promotores 35S (CaMV) y PG fue evaluada en los vectores de expresión 35S-GFP y PG-GFP mediante la fluorescencia de la proteína GFP. Los resultados obtenidos mediante la agro-infiltración y agro-inyección de hojas y frutos de tomates, respectivamente, corroboró la expresión fruto-específica del vector PG-GFP al ser observada fluorescencia sólo en frutos, y la expresión constitutiva del vector 35S-GFP al ser registrada fluorescencia tanto en frutos como en hojas. Este experimento demostró que ambos promotores

son funcionales, dado que en iguales condiciones, los controles negativos no mostraron fluorescencia detectable.

La funcionalidad de los vectores de sobre-expresión de *MdSDH2* (35S-*MdSDH2* y PG-*MdSDH2*) fue evaluada mediante su expresión en frutos de durazno y hojas de tabaco transformados de manera transitoria, utilizando RT-PCR (sección 4.3.2). Expresión de *MdSDH2* fue detectable en muestras de hoja y frutos transformados con el vector de expresión constitutiva: 35S-*MdSDH2*, mientras que la expresión fruto-específica del vector PG-*MdSDH2* fue corroborada al observar el amplificado correspondiente a *MdSDH2* sólo en muestras de frutos. Comparando las intensidades de fluorescencia en geles de agarosa del producto de PCR obtenido para las muestras de frutos PG-*MdSDH2* y 35S-*MdSDH2* se pudo observar una mayor cantidad de amplificado para este último (Figura 18). Esto indicaría que la fuerza de expresión del promotor constitutivo 35S sería mayor que la del promotor de PG, sin embargo este dato no es concluyente debido principalmente a dos razones: diferentes estados de maduración del fruto influyen en la activación/regulación del promotor PG (variable que no fue manejada en el experimento) y que la técnica utilizada, RT-PCR, no permite cuantificar el nivel de transcrito (a diferencia de otras técnicas como qRT-PCR). Sin embargo los resultados observados constatan el funcionamiento de ambos vectores y demuestra que existe expresión del ADNc de *MdSDH2* a un nivel detectable.

La sobre-expresión de un gen endógeno, como *MdSDH2*, en manzanos podría desencadenar el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT), mediante co-supresión. Este fenómeno se observa cuando los niveles de expresión del gen superan al umbral endógeno, siendo descrito en otros sistemas vegetales. En petunia, por ejemplo, se observó SGPT al sobre-expresar el gen chalcona sintasa (CHS) endógeno de petunia utilizando una construcción de ADN que contenía el promotor 35S (Napoli y cols, 1990). La sobre-expresión fruto-específica de *MdSDH2* podría evitar el SGPT si los niveles de expresión no son tan altos para superar el umbral endógeno. Sin embargo esta posibilidad no debe ser descartada, lo cual nos hace cuestionar:

¿Es *MdSDH2* la enzima que tiene que ser sobre-expresada en los frutos de manzano para aumentar su dulzor, o es más eficiente la sobre-expresión de un *SDH* exógeno, proveniente de otra especie vegetal? Con este fin, en nuestro laboratorio fue clonada previamente la secuencia descrita para *SDH* en tomate (*LeSDH*: AB183015,) con el objetivo de evaluar a largo plazo cual enzima, *MdSDH2* o *LeSDH*, es más eficiente en la conversión de sorbitol a fructosa en manzanos.

Implementar un sistema de transformación estable en una especie vegetal de ciclo de vida corto permitiría evaluar de forma previa la expresión y actividad de *MdSDH2* y *LeSDH* en frutos. En este contexto, el tomate resulta ser un buen candidato y modelo interesante para el estudio funcional de genes. En el presente Seminario de Título se implementó la técnica de transformación estable de tomate con una eficiencia cercana al 10%, acorde a lo registrado en la literatura (Frary y Earle, 1996). Tanto las concentraciones de hormonas como las condiciones y tipo de explante utilizados fueron adecuados para lograr la regeneración y el desarrollo de plántulas de tomate transgénico, luego de 8 meses de cultivo. A si mismo, la concentración suplementada de higromicina a los medios permitió seleccionar apropiadamente explantes transformantes, al impedir el desarrollo de aquellos no transformados previamente con *A. tumefaciens* portadora de los vectores de expresión (control negativo; Figura 23).

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En este Seminario de Título, mediante el uso de herramientas de biología molecular se propuso clonar la isoforma 3 de *SDH* descrita en manzanas (*MdSDH3*) logrando aislar y clonar en un vector bacteriano el ADNc correspondiente a la isoforma 2 de *SDH* de manzanas (*MdSDH2*), variedad Fuji. A partir de esta construcción fueron generados vectores de sobre-expresión en donde el ADNc de *MdSDH2* fue controlado por el promotor fruto-específico de la poligalacturonasa (PG) y un promotor constitutivo (CaMV 35S). Análisis moleculares, mediante transformación transitoria de frutos y hojas de tabaco, indicaron que la expresión de *MdSDH2* a partir de las construcciones generadas era detectable y la esperada en los distintos órganos evaluados, logrando corroborar la funcionalidad de los vectores de expresión fruto-específica y constitutiva para *MdSDH2* en plantas (PG-*MdSDH2* y 35S-*MdSDH2*, respectivamente).

En este contexto, como proyección a corto plazo, se espera realizar ensayos bioquímicos de frutos transformados transitoriamente con los vectores de sobre-expresión, mediante la producción de NADH⁺ (detectable a 340 nm) en extractos crudos de proteínas, usando sorbitol como sustrato. Este ensayo permitirá evaluar la actividad de *MdSDH2*, corroborando también la funcionalidad de los vectores a nivel bioquímico.

Además, en este Seminario de Título fue posible implementar un sistema de transformación estable de tomate, mediante organogénesis somática y *A. tumefaciens* con buena eficiencia (~10%). En un futuro próximo esta plataforma permitirá evaluar y comparar de forma preliminar *SDHs* vegetales, como *LeSDH* y *MdSDH2*, a nivel molecular y bioquímico. Estos análisis previos permitirán identificar cuál *SDH* es la más apropiada para ser sobre-expresada en manzanos con el objetivo de generar en el mediano plazo una variedad de manzanas chilenas (variedad Fuji), con frutos de mayor dulzor.

Cabe destacar que las exportaciones de frutos de la familia Rosaceae (manzanas, peras, damascos, cerezas, duraznos, entre otros) dan cuenta de aproximadamente la mitad del

volumen de la fruta fresca exportada por Chile (www.indap.gob.cl). Todas estas especies, en mayor o menor grado, también movilizan sorbitol en el floema, lo cual es almacenado y/o convertido a fructosa en los frutos. Por lo tanto, y de acuerdo a las necesidades de los consumidores y la industria frutícola chilena, se podrían utilizar los vectores construidos en este Seminario de Título para alterar sus características de dulzor, una vez implementado un sistema de transformación génica apropiado.

7. CONGRESOS

María Francisca Aguayo, Yu Wen Tang, María Sofía Zamudio, Michael Handford. (2009). SORBITOL METABOLISM IN PLANTS. Cuarta reunión anual de la sociedad de Biología Vegetal, Centro de convenciones Hotel de la Bahía, La Serena, Chile. 14 a 16 de Octubre. (Poster Session) **Premio al mejor póster.**

Diego Ampuero, **María Francisca Aguayo**, Michael Handford. (2009). METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PLANTAS. 60° Congreso Agronómico de Chile, Hotel Casino de Talca, Talca, Chile, 27 al 30 de Octubre (Poster session).

8. REFERENCIAS

- Ampuero D (2010).** Análisis del patrón de expresión, mediante técnicas moleculares, de GONST3 y GONST4, transportadores de nucleótido-azúcar de *Arabidopsis thaliana* (2010). Seminario de Título. Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Bird C R, Smith C J S, Ray J A, Moureau P, Bevan M W, Bird A S, Hughes S, Morris P C, Grierson D y Schuch W (1988).** The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **11**: 651-662.
- Brookfield P, Murphy P, Harker R and MacRae E (1997)** Starch degradation and starch pattern indices; interpretation and relation to maturity. *Postharvest Biol. Technol.* **11**: 23-30.
- Burt B (2006).** JADA Continuing Education: The use of sorbitol- and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *J Am Dent Assoc.* **137**: 190-196.
- Caroca R (2007).** Identificación de PpCBF en *Prunus pérsica*: Un gen ortólogo funcional de la familia DREB1/CBF de *Arabidopsis Thaliana*. Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Chomczynski P y Sacchi N (2006).** The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols.* **1**: 581-585.
- Chyi Y y Phillips G (1987).** High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep* **6**: 105-108.
- Doyle J y Doyle L (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**:11-15.
- Frary A y Earle E (1996).** An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep* **16**: 235-240.
- Gao Z, Jayanty S, Beaudry R and Loescher W (2005).** Sorbitol transporter expression in apple sink tissues: Implications for fruit sugar accumulation and watercore development. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* **130**: 261-268.
- Hajdukiewicz P, Svab Z y Maliga P (1994).** Small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25** (6): 989-994.
- Hewstone N, Valenzuela J y Muñoz C (2007).** Isela-INIA, a new table grape cultivar. *Agricultura Técnica Chile* **67**(2):201-204.
- Jackson J (2003).** *Biology of Apples and Pears.* Cambridge University Press. Pag 238.
- Janick J, Cummins J, Brown S and Hemmat M (1996).** Apples In *Fruit Breed, Volume I: Tree and Tropical Fruits*, edited by Janick J and Moore JN. John Wiley & Sons pp 1-77
- Levy M, Rachmilevitch S and Abel S (2005).** Transient *Agrobacterium*-Mediated gene expression in the *Arabidopsis* Hydroponics root system for subcellular localization studies. *Plant Molecular Biology reporter* **23**: 179-184.

- Lindstad R, Koll P, McKinley-McKee J. (1998)** Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Biochem.J.* **330**: 479-487.
- Lo Bianco R, Rieger M and Sung SJ. (1999)**. Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach cultivar 'Encore'. *Tree Physiol.* **19**: 103-109.
- Loescher W H, Marlow G C y Kennedy R A. (1982)**. Sorbitol metabolism and source-sink interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol* **70**: 335-339.
- Mandujano P (2008)** Construcción y evaluación de vectores para sobre-expresar la sorbitol deshidrogenasa de tomate (*LeSDH*) en plantas. Seminario de Título, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Marini I, Bucchioni L, Borella P, Corso A, Mura U (1997)** Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**: 383-391.
- Matsumoto K, Barbosa C, Batista J y Damares C (2009)**. *Agrobacterium*-mediated transient expresión system in banana immature fruits. *African Journal of Biotechnology.* **8(17)**: 4039-4042.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R y Fraley R (1986)**. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* **5**:81-84.
- Moggia C and Pereira M (2006)**. Almidón y maduración en manzanas. *Pomácea* **6**: 1-3.
- Montgomery J, Pollard V, Deikman J y Fischer R (1993)**. Positive and Negative Regulatory Regions Control the Spatial Distribution of Polygalacturonase Transcription in Tomato Fruit Pericarp. *The Plant Cell.* **5**:1049-1062.
- Murashige T, Skoog F (1962)**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497.
- Ng K, Ye R, Wu X, Wong S (1992)** Sorbitol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 24989-24994.
- Norambuena L, Nilo R, Handford M, Reyes F, Marchant L, Meisel L y Orellana A (2005)**. AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable de transporting UDP-galactosa. *Planta.* **222**: 521-529.
- Nosarszewski M, Clements A M, Downie A B y Archbold D D (2004)**. Sorbitol dehydrogenase expression and activity during apple fruit set and early development. *Physiologia Plantarum.* **121**: 391-398.
- ODEPA: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.** (www.odepa.gob.cl).
- ODEPA (2005)**. Agricultura chilena 2014, una perspectiva a mediano plazo. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.
- ODEPA (2009)**. Situación de la industria de la fruta fresca en la temporada 2008/2009. Jaime Bravo Mina. Ministerio de Agricultura. Oficina de estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile.

- Ohta K, Moriguchi R, Kanahama K, Yamaki S y Kanayama Y (2005).** Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochem.* **66**: 2822–2828.
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland W y Granell A (2006).** Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* **140(1)**:3-11.
- Oura Y, Yamada K, Shiratake K and Yamaki S (2000).** Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochem.* **54**: 567-572.
- Park S , Song K, Kim M, Hwang J, Shin Y, Kim W y Chung W (2002).** Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Science.* **162**: 513–519.
- Patrick J and Offler C (2001).** Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *Journal of Experimental Botany.* **52** (356); 551-564.
- Pauly T, Ekstrom J, Beebe D, Chrnyk B, Cunningham D, Griffor M, Kamath A, Lee S, Madura R, Mcguire D, Subashi T, Wasilko D, Watts P, Mylari B, Oates P, Adams P y Rath V (2003).** X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. *Structure.* **11**: 1071–1085.
- Picard V, Erdsdal-Badju E, Lu A y Clark S (1994).** A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Research.* **22** (13): 2587-2591.
- Pozueta J, Houlné G, Cañas L, Schantz R y Chamarro J (2001).** Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **67**: 173–180.
- Saker M, Hussein H, Osman N y Soliman M (2008).** *In vitro* production of transgenic tomatoes expressing defensin gene using newly developed regeneration and transformation system. *Arab J. Biotech.* **11**: 59-70.
- Spolaore S, Trainotti L y Casadoro G (2001).** A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany* **52** (357): 845-850.
- Teo G, Suzuki Y, Uratsu S L, Lampinen B, Ormonde N, Hu W K, DeJong T M y Dandekar A M (2006).** Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *PNAS.* **103**: 18842–18847.
- Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A y Choi C (2007).** *Agrobacterium*-mediated Genetic transformation in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* **3** (1): 24-32.
- Wroblesky T, Tomczak A y Michelmore R (2005).** Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **3**:259-273.
- Yamada H, Kaga Y and Amano S (2006).** Cellular compartmentation and membrane permeability to sugars in relation to early or high temperature-induced watercore in apples. *Sci Hort* **108**: 29-34.

Yamada K, Oura Y, Mori H and Yamaki S (1998). Cloning of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit and gene expression. *Plant Cell Physiol.* **39:** 1375-1379.

Yamaguchi H, Kanayama Y and Yamaki S (1994). Purification and properties of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.* **35:** 887-892.

Yang Y, Rugang L y Qi M (2000). In vivo análisis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* **22(6):** 543-551.

Zhang L, Peng Y, Pelleschi-Travier S, Fan Y, Lu Y, Lu Y, Gao X, Shen Y, Delrot S and Zhang DP (2004). Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol.* **135:** 574-586.